Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. A. M. Kellerer

VERSUCH DER UNTERDRÜCKUNG DER EXPERIMENTELLEN ALLERGISCHEN ENCEPHALOMYELITIS (EAE) DURCH RADIOANTIGENSUIZID

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Dieter Englert
aus Heigenbrücken

Würzburg, den 27. Oktober 1980

1981

Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. A. M. Kellerer

VERSUCH DER UNTERDRÜCKUNG DER EXPERIMENTELLEN ALLERGISCHEN ENCEPHALOMYELITIS (EAE) DURCH RADIOANTIGENSUIZID

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Dieter Englert

aus Heigenbrücken

Würzburg, den 27. Oktober 1980

Referent: Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. K. Hempel

Korreferent: Prof. Dr.med. H. G. Mertens

Dekan: Prof. Dr.med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 1. 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

M E I N E R L I E B E N F R A U

U N D

M E I N E N L I E B E N E L T E R N

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543512_0071

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Autoimmungeschehen bei der EAE	1
1.2	Suppression und Therapie der EAE	3
1.3	Prinzip des Radioantigensuizids und seine Anwendung	3
1.4	Fragestellung und methodisches Vorgehen	5
2.	MATERIAL	7
3.	TIERHALTUNG	7
4.	METHODIK	8
4.1	Isolierung des basischen Myelinproteins (MBP, A1)	8
4.2	Bereitung des Injektionsgemisches und Erzeugung einer aktiven EAE bei Lewis-Ratten	8
4.3	Entnahme der Lymphknoten und Aufbereitung der Lymphozyten	9
4.4	Erzeugung der passiven EAE durch Lymphozyten	10
4.5	Schweregradeinteilung der EAE	11
4.6	Histologische Untersuchung der aktiven und passiven EAE	11
4.7	Motilität bei Ratten mit passiver EAE	12
4.8	Bestrahlung von sensibilisierten Lymphozyten	12
4.9	Markierung des A1 - Proteins mit ^{125}J	13
4.10	Autoradiografischer Nachweis der sensibilisierten Zellen	14

		Seite
4.11	Radioantigensuizidversuche mit sensibilisierten Lymphozyten	15
5.	ERGEBNISSE	16
5.1	Reinheitskontrolle des basischen Myelinproteins	16
5.2	Krankheitsverlauf der aktiven EAE	16
5.3	Passive EAE	24
5.3.1	Einfluß der Zellzahl	24
5.3.2	Motilitätsänderungen	27
5.3.3	Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten	31
5.4	Lymphozyten mit A1 - spezifischen Rezeptoren	32
5.5	Radioantigensuizidversuche mit sensibilisierten Zellen	36
5.6	Quantifizierung der histopathologischen Veränderungen bei passiver EAE	38
6.	DISKUSSION	42
6.1	Aktive EAE	42
6.1.1	Klinik	42
6.1.2	Pathophysiologie	42
6.2	Was ist bei der Übertragung der passiven EAE zu beachten?	44
6.2.1	Einfluß des Entnahmeortes, des Zeitpunktes und des Übertragungsweges	44
6.2.2	Synergismus zwischen Spender- und Empfängerlymphozyten	45
6.2.3	Mindestzellzahl	45
6.2.4	Bedeutung der Adjuvansarthritis	47

		Seite
6.2.5	Histologie der passiven EAE	48
6.2.5.1	Unterschiede zur aktiven EAE	48
6.2.5.2	Korrelation zwischen entzündlichen Infiltraten und der klinischen Symptomatik	49
6.3	Strahlenempfindlichkeit von Lymphozyten	50
6.3.1	Unterschiede zwischen B - und T - Zellen	50
6.3.2	Erhöhte Strahlenresistenz bei aktivierten Lymphozyten	51
6.3.3	Verlust der Encephalitogenität der EAE - Lymphozyten durch Inkubation nach Bestrahlung	53
6.4	A1 - bindende Lymphozyten	53
6.4.1	Verschiedene Nachweismethoden	53
6.4.2	Differenzierung der Zellen	55
6.4.3	Markierte Lymphozyten in den CFA - Kontrollen	56
6.4.3.1	Kreuzreaktivität zwischen A1 - Protein und mykobakteriellem Antigen	56
6.4.3.2	Suppression der EAE durch CFA - Vorbehandlung	57
6.5	Radioantigensuizid	58
6.5.1	Anforderungen an die Eigenschaften eines brauchbaren Isotops	58
6.5.2	Einfluß des Bindungsortes auf die biologische Wirksamkeit ionisierender Strahlung	59
6.5.3	Strahlendosis in unseren Versuchen	61
6.5.4	Mögliche Ursachen für das Nichtgelingen unserer Radioantigensuizidversuche	62
6.5.4.1	Unterschiede zu erfolgreichen Versuchen anderer Autoren	62

		Seite
6.5.4.2	Konkurrenz zwischen Radioantigensuizid und Antigenstimulation	64
7.	ZUSAMMENFASSUNG	66
8.	LITERATURVERZEICHNIS	I - XIV
9.	ABKÜRZUNGEN	XV

1. E I N L E I T U N G

1.1 Autoimmungeschehen bei der EAE

Die experimentelle allergische Encephalomyelitis ist eine Autoimmunerkrankung, die bei verschiedenen Tierspezies provoziert werden kann. Wegen Parallelen zur Multiplen Sklerose wurde sie als Modell für diese menschliche Erkrankung herangezogen.

Lipton und Freund (48) erzeugten 1953 erstmals eine EAE bei Ratten durch intracutane Injektion einer Emulsion aus Gewebe des Zentralnervensystems von Ratten oder Meerschweinchen und Adjuvantien, die getrocknete Tuberkelbakterien oder Norcardia asteroides enthielten.

Erst 1965 konnte das eigentliche Antigen, das basische Myelinprotein (MBP) oder A1 - Protein genannt, aus dem Myelin isoliert, sein Molekulargewicht mit ca. 18 000 errechnet und seine Aminosäuresequenz bestimmt werden. Die encephalitogenen Determinanten dürften aus der folgenden Aminosäuresequenz bestehen, die hier für das bovine A1 - Protein wiedergegeben ist (51):

```
  34                                                    46
-Gly-Ile-Leu-Asp-Ser-Leu-Gly-Arg-     Phe-Gly-Ser-Asp-

 107                                                   118
-Gly-     Leu-     Ser-Leu-Arg-Phe-Ser-Trp-Gly-Ala-Glu-
```

Das A1 - Protein ist ein organ- aber nicht speziesspezifisches Protein, d. h. man kann mit dem Protein von Meerschweinchen bei Ratten eine EAE induzieren (75). Allerdings ist die antigene Potenz bei verschiedenen Tierarten unterschiedlich. So kann man mit bovinem A1 - Protein bei Meerschweinchen eine fast immer fatal endende EAE auslösen, wohingegen bei Ratten allenfalls milde Symptome auftreten. Zur Erzeugung einer EAE bei Ratten verwendet man günstigerweise A1 - Protein der gleichen Tierart oder von Meerschweinchen.

Nachdem Lipton und Freund schon 1953 (49) die EAE durch Parabiose von einem kranken auf ein gesundes Tier übertragen hatten, gelang es Paterson im Jahre 1960 (59), die Erkrankung durch Lymphozyten von gegen A1 - Protein sensibilisierten Tieren auf gesunde Empfänger zu transferieren. Mußten damals die Ratten noch durch Übertragung von Milzzellen der Spendertiere auf die neugeborenen späteren Empfänger vorbehandelt werden, um eine Immuntoleranz für die in der Folge verabreichten sensibilisierten Lymphozyten zu schaffen, so steht uns heute mit dem ingezüchteten Lewis - Stamm, der homozygot für die Immunantwort EAE ist (22, 52, 91), Tiermaterial zur Verfügung, zwischen dem wir ohne vorherige Manipulation Zellen übertragen können.

Da die Versuche, die EAE durch Serum und damit durch Antikörper oder sonstige Serumfaktoren zu übertragen, mißlangen (61), lag der Schluß nahe, daß es sich bei dieser Erkrankung um ein T Lymphozyten induziertes Geschehen handelt, was in Arbeiten

vieler anderer Autoren bestätigt wurde (20, 56, 80). Gonatas et al. (1974) zeigten, daß Lewis - Ratten, die keine T - Zellen mehr hatten (B - Ratten), auch keine EAE entwickelten (27).

1.2 Suppression und Therapie der EAE

Nachdem der Pathomechanismus der EAE soweit aufgeklärt war, suchte man Möglichkeiten der Suppression und Therapie. Mit mehr oder weniger Erfolg wurden verschiedene Verfahren gefunden und untersucht (Tab. 1). Deren Übernahme in die Therapie der Multiplen Sklerose hat sich jedoch, sieht man einmal von der krankheitsverzögernden Wirkung des Azathioprins oder einiger Zytostatika auf manche Formen der MS ab, bislang nicht bewährt (28, 66). Auch die Behandlung der MS mit basischem Myelinprotein ergab kontroverse Resultate (11, 29) und ist mit großer Wahrscheinlichkeit zumindest als Monotherapie untauglich (3).

1.3 Prinzip des Radioantigensuizids und seine Anwendung

Aufbauend auf die Arbeit von Ada und Byrt (1), die 1969 mittels Inkubation von Lymphozyten mit ^{125}J - markierten Proteinen die Antikörpersynthese auf nachfolgende Stimulierung durch das gleiche Protein unterdrücken konnten, wurde in Experimenten von Basten et al. (7), Roelants und Askonas (73) und Cooper

Tab. 1 Versuche zur Prävention, Suppression und Therapie der EAE

Methode	Spezies	Autoren	Jahr
Behandlung mit Gehirnhomogenat	Meerschweinchen	Ferraro et al. (21)	1949
Vorbehandlung mit CFA	Meerschweinchen	Kies et al. (38)	1958
Ganzkörperbestrahlung	Lewis - Ratten	Levine et al. (44)	1969
Bestrahlung der sensibilisierten Lymphozyten vor Übertragung	Lewis - Ratten	Purdy et al. (71)	1971
Gabe von synthetischen Copolymeren	Meerschweinchen	Teitelbaum et al. (79)	1972
Protektion mit nichtencephalitogenen MBP - Bruchstücken	Meerschweinchen	Hashim et al. (31) (32)	1973 1975
Behandlung durch Serum mit hohem Alpha - Globulingehalt	Lewis - Ratten	Vandenbark et al. (84)	1974
Gabe von MBP bei aktiver EAE	Meerschweinchen Affen	Driscoll et al. (14) Alvord et al. (4)	1974 1979
Gabe von MBP bei passiver EAE	Meerschweinchen	Driscoll et al. (15)	1975
Protektion mit MBP - Bruchstücken	Meerschweinchen	Driscoll et al. (16)	1976
Radioantigensuizid bei aktiver EAE	Lewis - Ratten	Ortiz-Ortiz et al. (57)	1976
Verschiedene Medikamente (Zytostatika, Corticosteroide etc.)		(8, 37, 45, 62, 69, 78, 88)	

und Ada (12) gezeigt, daß sie auf diese Weise nicht nur B - sondern auch T - Lymphozyten inaktivieren können. Insofern erschien uns diese Methode, die als Radioantigensuizid bezeichnet wird, ein aussichtsreicher Weg auf der Suche nach Therapiemöglichkeiten der EAE

Das Prinzip des Radioantigensuizids beruht auf der natürlichen immunologischen Reaktionsfähigkeit von Lymphozyten mit entsprechenden Antigenen, welche dabei wahrscheinlich an Antikörper der Zelloberfläche angelagert werden. Gelingt es nun, die für eine Immunantwort verantwortlichen Zellen mit dem radioaktiv markierten Antigen zu erreichen, so setzen sich diese Zellen aufgrund ihrer Immunreaktion einer weit höheren Strahlenbelastung aus als nicht - sensibilisierte Lymphozyten und können dadurch zerstört werden. Ein ähnliches Prinzip verfolgen z. B. Ghose et al. (24) bei der Krebstherapie, indem sie radioaktiv markierte Antikörper gegen einen Tumor in ein diesen Tumor tragendes Tier injizieren und so eine selektive "Zerstrahlung" des Tumors hervorrufen.

1.4 Fragestellung und methodisches Vorgehen

Anhand des EAE - Modells bei der Lewis - Ratte versuchten wir den Radioantigensuizid bei sensibilisierten Lymphozyten durchzuführen. In Abbildung 1 sind Versuchsaufbau und Fragestellung der vorliegenden Arbeit schematisch dargestellt.

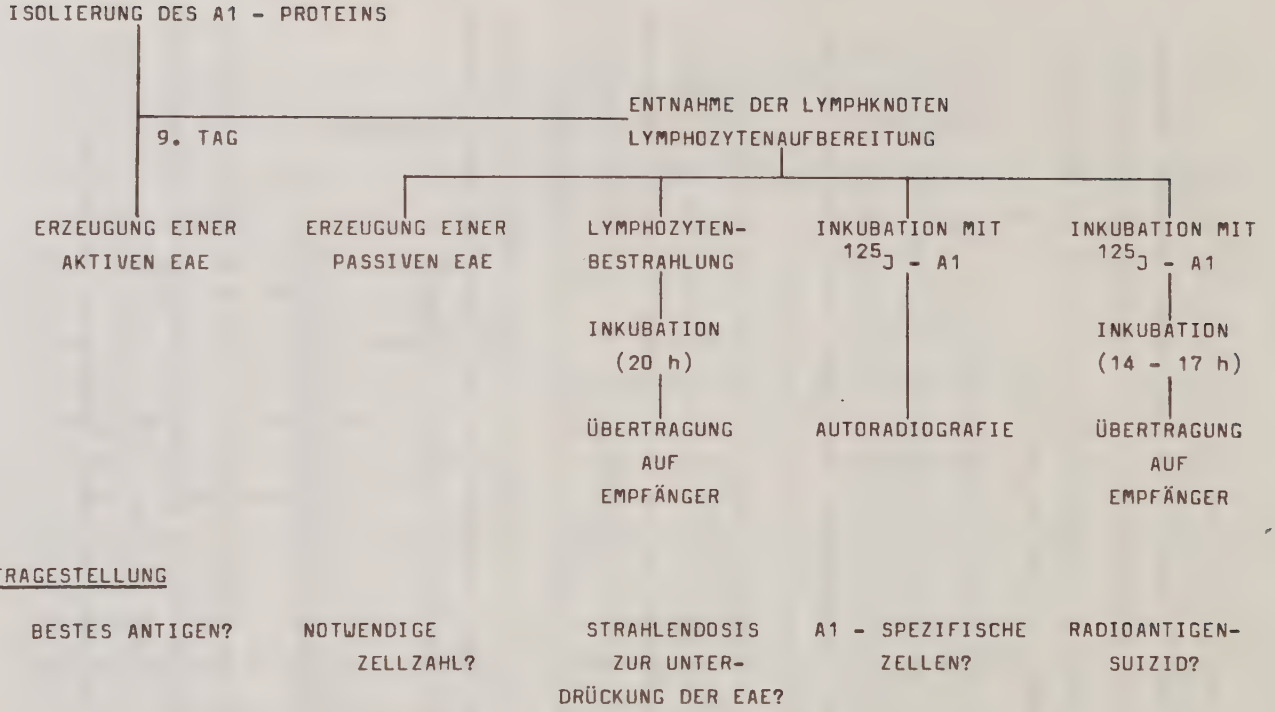


Abb. 1 Versuchsaufbau und Fragestellung der vorliegenden Arbeit

2. M A T E R I A L

RPMI 1640	Seromed, München
Fötales Kälberserum	Seromed, München
Komplettes Freundsches Adjuvans	Behringwerke, Marburg
Mycobacterium Tuberculosis, H37 RA	Difco Laboratories, Detroit, USA
^{125}J im V - Gefäß hochkonzentriert (1 Ci/ml) in 0,1 N NaOH gelöst, Radiochem. Reinheit 99 % Radionuklid-Reinheit 99 % spez. Aktivität: trägerfrei, ca. 17 Ci/mg	NEN, Dreieich
Fotoemulsion K 2	Ilford, Essex, England
Aluminium Hydroxide Gel Alhydrogel, 2 % Al_2O_3, 3 % $Al(OH)_3$	Superfos Export, Vedbæk, Dänemark
Lewis - Ratten	Dr. E. Günther, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg

3. T I E R H A L T U N G

Die Ratten wurden in 42 cm x 26 cm x 15 cm großen, durchsichtigen Plastikkäfigen gehalten. Hell- und Dunkelphasen dauerten je 12 Stunden bei einer konstanten Raumtemperatur von 23°C. Altromin - Trockenfutter (Altrogge Spezialfutterwerk, Lage) und Wasser hatten die Tiere stets ohne Beschränkung zur Verfügung.

4. METHODIK

4.1 Isolierung des basischen Myelinproteins (MBP, A1)

Frisch entnommene Gehirne von ausgewachsenen Meerschweinchen oder Rückenmark von Rindern, das wir ca. eine halbe Stunde nach Tötung der Tiere erhalten haben, werden in Chloroform - Methanol 2/1 (v/v) homogenisiert und nach der Methode von Deibler et al. (13) aufbereitet. Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS - Gelelektrophorese überprüft.

4.2 Bereitung des Injektionsgemisches und Erzeugung einer aktiven EAE bei Lewis - Ratten

Fünf Volumenteile komplettes Freundsches Adjuvans (5 mg hitzegetötete Tuberkulosebakterien H37 RA/ml), 4 Teile Aluminiumhydroxid und 1 Teil physiologischer Kochsalzlösung, in der soviel A1 - Protein gelöst wird, daß 0,1 ml des Gesamtgemisches 50 µg enthalten, werden durch oftmaliges Aufziehen in eine Einmal - Spritze über eine Kanüle No. 1 solange vermengt, bis eine Wasser in Öl - Emulsion entstanden ist. Die Emulsion hat dann die richtige Konsistenz, wenn ein Tropfen davon in Wasser nicht mehr verläuft. Durchgeführt wird das Verfahren in einem Eisbad. Für die Kontrollversuche wurde das gleiche Gemisch jedoch ohne A1 - Protein hergestellt.

Die Versuchstiere erhalten eine leichte Äthernarkose. Dann

werden pro Tier 0,1 ml des encephalitogenen Gemisches bzw. des Kontrollgemisches in die Vorder- und Hinterpfoten und in die seitlichen Beinpartien intracutan appliziert. Wir verwendeten hierzu InjektionskanÜlen No. 16.

4.3 Entnahme der Lymphknoten und Aufbereitung der Lymphozyten

Acht bis zehn Tage, in der Regel am neunten Tag nach Sensibilisierung wurden die Ratten durch eine Überdosis Äther getötet und die inguinalen, poplitealen und paraaortalen Lymphknoten excidiert. Das sind die Lymphknoten, welche die entsprechenden Hautareale der Injektionsstellen drainieren. In ihnen erwarten wir also eine massive lymphozytäre Proliferation als Antwort auf den Antigenreiz. Diese Lymphknoten sind gegenüber denen bei unbehandelten Tieren um ein Vielfaches größer und springen nach Fellschnitt und Muskelspaltung hervor. Nach der Entnahme werden die Lymphknoten sofort in eisgekühltes Nährmedium gegeben. Als Nährmedium verwendeten wir RPMI 1640 + 10 % FCS + 15 mM NaN_3 + Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B. Nach Entfernung von anhängendem Fett und Bindegewebe werden die Lymphknoten durch ein engmaschiges Zellsieb passiert und die nunmehr frei vorliegenden Lymphozyten in Nährmedium aufgefangen. Die sich anschließende Zellpräparation wird nach der Methode von Mishell und Dutton (54) ausgeführt. In sterilen Reagenzgläsern läßt man die Zellsuspension 5 - 10 Minuten im Eisbad stehen, damit sich gröbere Partikel absetzen können. Der Überstand wird in 10 ml - Zen-

trifugenröhrchen pipettiert und in der Tischzentrifuge bei $4^{o}C$ und 1 000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert. Danach liegen die Zellen dicht gepackt in einem weißen Sediment vor. Der jetzt klare Überstand wird verworfen, und die Lymphozyten werden in der gewünschten Konzentration in Medium resuspendiert. Die gesamte Zellaufbereitung ist unter möglichst sterilen Bedingungen durchzuführen. Unseren Erfahrungen zufolge erhält man die zur Übertragung der passiven EAE notwendige Zellzahl von $2 - 3 \times 10^{8}$, wenn man die Lymphknoten von 2 Ratten in der oben beschriebenen Art aufbereitet.

4.4 Erzeugung der passiven EAE durch Lymphozyten

Je 1 ml Zellsuspension wird intravenös auf die Empfängertiere übertragen. Nach einer leichten Äthernarkose erleichtert ein kurzzeitiges Eintauchen des Schwanzes in warmes Wasser das Einführen einer Injektionskanüle No. 16 in ein Schwanzgefäß. Unter sorgfältiger Beobachtung von Atmung und Herztätigkeit wird das Volumen langsam infundiert. Bei korrekter intravenöser Lage der Kanüle geht die Infusion ohne Widerstand und Schwierigkeiten vonstatten. Paravenös läßt sich eine solche Flüssigkeitsmenge nur gewaltsam in den Schwanz der Tiere verabreichen. Vor dem Erwachen aus der Narkose wurden die Tiere gewogen und gekennzeichnet.

Als Empfänger fungierten überwiegend weibliche Ratten aus dem gleichen Wurf wie die Zellspender. Dies gilt sowohl für die

Versuche mit dem A1 - Protein als auch für die Kontrollen ohne das Markscheidenprotein. Außerdem verwendeten wir in unseren Versuchen Würfe, die nicht jünger als 2 und nicht älter als 6 Monate waren.

4.5 Schweregradeinteilung der EAE

Klinische Zeichen der experimentellen allergischen Encephalomyelitis sind: Gewichtsverlust, struppiges, urin- und kotverschmiertes Fell, Bewegungsarmut, unsicherer Gang, Schwanzlähmung, Lähmung der Hinterbeine, Tetraplegie, Urininkontinenz, Makrohämaturie, Tod.

Unsere Schweregradeinteilung der EAE lautet wie folgt:

0 - klinisch unauffällig
1 - Gewichtsabnahme über den Gewichtsverlust bei CFA - Kontrolltieren hinaus
2 - Schwanzlähmung
3 - Lähmung der Hinterbeine
4 - Tetraplegie, Tod

4.6 Histologische Untersuchung der aktiven und passiven EAE

Zur histologischen Untersuchung wurden bei 9 Ratten mit aktiver und bei 43 Tieren mit passiver EAE Gehirn, Rückenmark und Nervi ischiadici en bloc entnommen und in 4 % gepuffertem

Formalin fixiert. Außerdem wurden 4 Tiere am 4. Tag nach Zelltransfer vor dem Auftreten irgendwelcher klinischer Symptome getötet und deren ZNS auf Entzündungsherde untersucht. Von den CFA - Kontrollen wurden 2 Tiere neuropathologisch ausgewertet. Methodik und histologische Präparation sind von Günther et al. (27) beschrieben. Die histologische Aufarbeitung und Auswertung der Präparate von Tieren mit aktiver EAE wurde von Prof. Schimrigk, von solchen mit passiver EAE von Prof. Wechsler durchgeführt.

4.7 Motilität bei Ratten mit passiver EAE

Um die bei der passiven EAE bisweilen diskreten klinischen Läsionen objektivieren zu können, verwendeten wir den kurzzeitig von der Firma ABFARAD, Schweden, zur Verfügung gestellten Animex Acticity Meter, ein Gerät, das Grob- und Feinbewegungen der Versuchstiere in ihrer normalen Käfigumgebung registriert. Die Tiere wurden einige Zeit vor Versuchsbeginn mit dem Gerät überwacht, um das Normalverhalten zu studieren. Nach einigen Tagen wurden sensibilisierte Lymphozyten übertragen und die Motilitätsveränderungen vor, während und nach der Erkrankung festgehalten (19).

4.8 Bestrahlung von sensibilisierten Lymphozyten

Zur Bestrahlung der Zellen verwendeten wir eine Röntgenröhre

Marke MG 300 (Fa. C. H. Müller, Hamburg). Die Röhre wurde mit 250 kV Gleichstrom betrieben. Die Dosisleistung war 100 rad pro Minute. Als zusätzliche Filter waren 0,5 mm Al und 1 mm Cu vorgeschaltet. Das Strahlenfeld war über die ganze zu bestrahlende Fläche homogen. Die Zellsuspensionen wurden in Einzelportionen zu 1 ml in Falcon Petrischalen, Ø 35 mm, bestrahlt. Je 2 Portionen wurden mit 50, 100, 200, 400, 600, 800 und 1 000 rad bestrahlt, für 20 Stunden bei 4^{o}C inkubiert und auf die Empfänger übertragen. Als Kontrolle zu jeder Strahlendosis erhielt ein Empfängertier die gleiche Anzahl von Lymphozyten, die mit Ausnahme der Bestrahlung in identischer Weise behandelt wurden wie die vorbestrahlten. Zwei Tiere erhielten unbehandelte, sensibilisierte Zellen direkt nach deren Entnahme und Aufbereitung. Die Zelldosis betrug für alle Tiere zwischen 2,2 und 2,5 x 10^{8}. Zellspender und -empfänger stammten auch hier aus den gleichen Würfen. Am 8. Tag nach Zelltransfer wurden die Tiere getötet und deren Gehirn und Rückenmark histologisch untersucht.

4.9 Markierung des A1 - Proteins mit ^{125}J

Das A1 - Protein wird mit ^{125}J nach der Chloramin T - Methode jodiert (36) und über CM 52 - Cellulose (Whatman, Springfield Mill, Maidstone, England) gereinigt. Anschließend wird der Anteil des proteingebundenen Jods mittels Cellogelelektrophorese chromatografisch bestimmt. Er betrug 90 - 95 %. Die

Immunreaktivität bleibt hierbei unverändert, wie Schmid et al. im hiesigen Labor nachgewiesen haben (74). Jodiertes Protein verschiedener Aktivität wurde sowohl für die Autoradiografie als auch für die Versuche mit dem Radioantigensuizid benötigt. Für die Kontrollversuche zum Radioantigensuizid wurde das A1 - Protein mit ^{127}J markiert.

4.10 Autoradiografischer Nachweis der sensibilisierten Zellen

Für die Autoradiografie wurden 0,5 ml Zellsuspension (ca. 1 x 10^8 Zellen/ml) von mit A1 - Protein sensibilisierten Tieren bzw. von CFA - Kontrollen mit 20 µl neutralisierter ^{125}J - A1 - Lösung 30 Minuten lang im Eisbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1 x mit dem Medium und 2 x über einen FCS/RPMI 1640 - Gradienten (25 - 100 % FCS) gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen in einem Tropfen FCS aufgenommen und auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgepinselt. Nach der Fixation in Methanol:Essigsäure:Wasser (89:1:10) für 30 Minuten und einem ebenso langen Wässern der Präparate werden sie im Trockenschrank bei 28°C getrocknet. In der Dunkelkammer werden die Objektträger danach in Ilford K 2 Fotoemulsion gedippt und, nachdem sie trocken sind, in schwarze Kästchen verpackt. Nach 8 Tagen Expositionsdauer werden die Präparate entwickelt, fixiert und in Giemsalösung gefärbt. Bei der Inspektion der Präparate wurden alle Zellen als radioaktiv markiert gezählt, die eine mindestens 15 - fach stärkere Mar-

kierung hatten als die gleiche Fläche des Hintergrundes (Modifikation nach Yung et al. (93)).

4.11 Radioantigensuizidversuche mit sensibilisierten Lymphozyten

Jeweils 1 ml Zellsuspension (2,6 - 4,0 x 10^8 Zellen) wurden mit ^{125}J - A1 - Lösung unterschiedlicher Aktivität und unterschiedlichen Proteingehalts oder als Kontrolle mit ^{127}J - A1 30 Minuten lang im Eisbad inkubiert. Danach wurde wie bei der Autoradiografie 1 x mit Medium und 2 x über einen FCS/RPMI 1640 - Gradienten gewaschen, worauf die Lymphozyten nach weiterer Inkubationsdauer von 14 - 17 Stunden in die Schwanzvenen der Empfänger injiziert wurden. Gleiche Mengen an Lymphozyten wurden zur Kontrolle auch sofort nach Lymphknotenentnahme und Aufbereitung übertragen. Auch in diesen Versuchen wurden Spender und Empfänger jeweils aus dem gleichen Wurf genommen. Ein solcher Versuch enthielt immer mindest einen Empfänger aus den 3 Gruppen: Sofortübertragung bzw. Übertragung nach Inkubation mit ^{125}J - A1 oder ^{127}J - A1. Von allen Tieren aus diesen Versuchen wurden histologische Untersuchungen von Gehirn und Rückenmark durchgeführt.

5. E R G E B N I S S E

5.1 Reinheitskontrolle des basischen Myelinproteins

Abbildung 2 zeigt Elektrophoresen verschiedener Reinigungsstufen des angewandten Verfahrens. Die beiden letzten Gele geben die Proteinbande wieder, die entsteht, wenn man die Ablösung mit n/10 HCl von der CM 52 - Cellulose aufträgt. Es handelt sich hierbei um relativ reines A1 - Protein, wie auch aus dem Densitogramm in Abbildung 3 hervorgeht.

5.2 Krankheitsverlauf der aktiven EAE

Anfängliche Versuche, bei unseren Lewis - Ratten eine EAE mit bovinem A1 - Protein auszulösen, hatten keinen Erfolg. Von den 15 Ratten aus diesem Experiment hatten nur einige Tiere eine mäßige Gewichtsabnahme, die aber möglicherweise alleine durch die Applikation des CFA zustande kam. Neurologische Symptome konnten in keinem Fall registriert werden. Ebenfalls negativ fiel die histologische Auswertung der 5 untersuchten Tiere aus dieser Gruppe aus (Tab. 2).

Nach diesen unbefriedigenden Versuchen mit dem bovinen A1 - Protein sensibilisierten wir in den folgenden Experimenten unsere Ratten mit A1 - Protein aus dem ZNS von Meerschweinchen. Dieses Protein ist bei den Lewis - Ratten als starkes Antigen zur Induktion einer EAE bekannt (51).

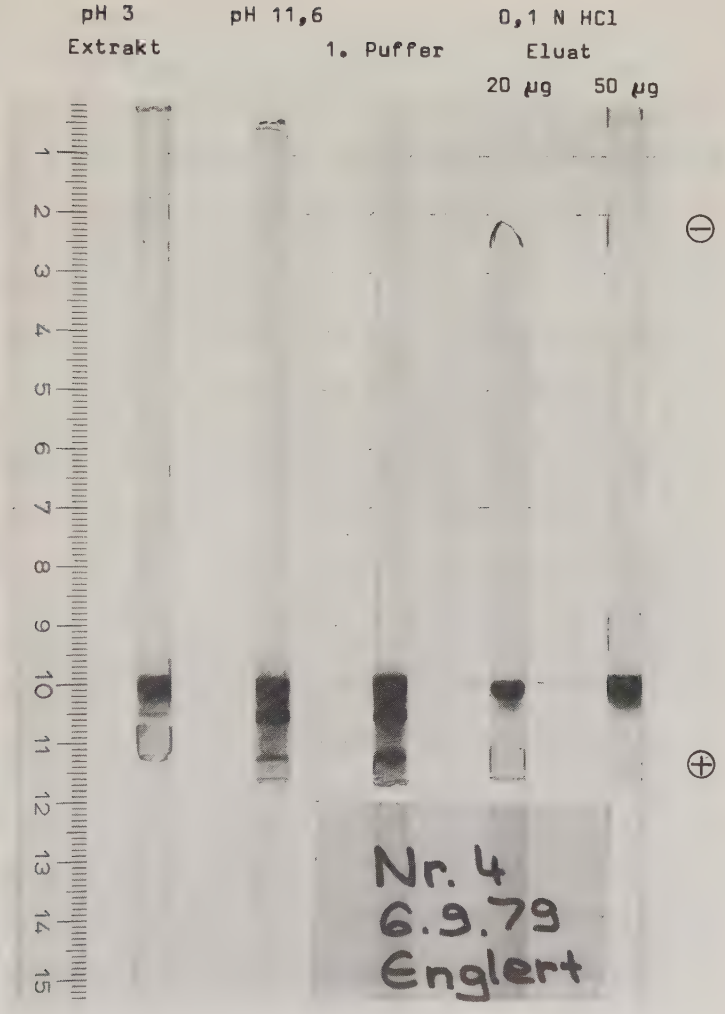


Abb. 2 Beispiel für die Isolierung von A1 - Protein aus Meerschweinchengehirn nach Deibler et al. (13) SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese verschiedener Reinigungsstufen; Proteinfärbung mit Coomassie - Blau

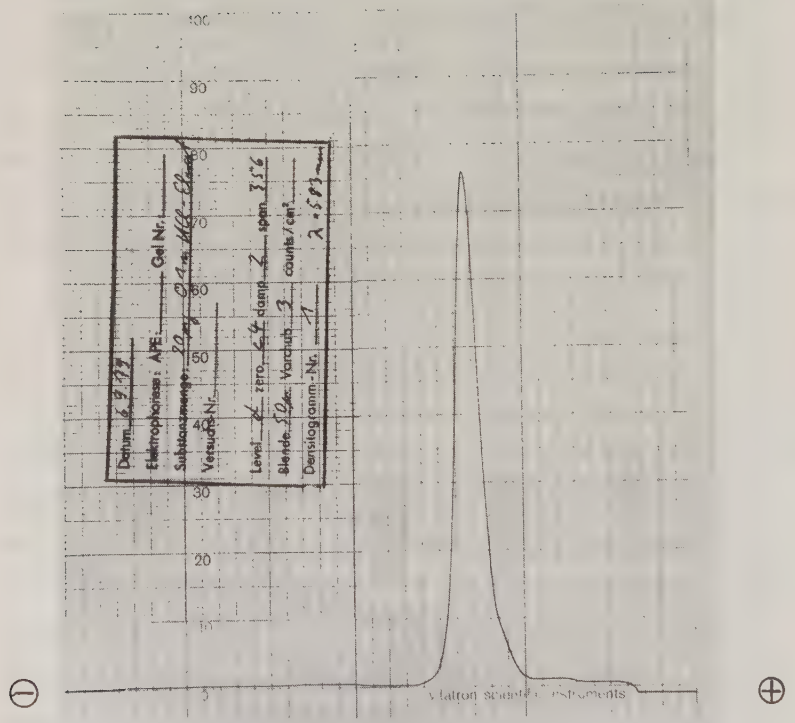


Abb. 3 Densitogramm zum Gel Nr. 4 (0,1 N HCl - Eluat, 20 µg) aus Abbildung 2
Angefertigt mit einem Vitatron - Densitometer TLD 100

Auch in unserem Labor hatten wir mit diesem Protein in 100 % der Fälle Erfolg. Die Ratten erkrankten zwischen dem 9. und 17. Tag, in der Regel am 12. bis 14. Tag. Nach einem anfänglichen Gewichtsverlust, der als das früheste EAE - Symptom bekannt ist, traten bereits ein oder zwei Tage später Lähmungen des Schwanzes und der Hinterbeine auf. Neben einem struppigen Fell, das meist in den hinteren Partien auch urin- und kotverschmutzt war - wohl aufgrund der Lähmungen, beobachteten wir in einigen Fällen auch Tetraplegien, Makrohämaturien und Tod der Tiere, der oft nach vorhergehenden Makrohämaturien eintrat. Möglicherweise ist hier ein kausaler Zusammenhang zu sehen, so daß der Tod der Tiere nicht unbedingt direkt auf Läsionen des ZNS zurückzuführen ist, sondern auf aufsteigende Infektionen der Harnwege infolge neurogener Blasenstörungen, wie auch von Paterson et al. (63) beschrieben. Sterben die Tiere nicht an den Folgen der EAE, so erholen sie sich nach 4 - 6 Tagen wieder vollständig von ihren Lähmungen. Außer bei zwei Ausnahmen, die nach einer kurzen Periode nochmals geringe Lähmungserscheinungen aufwiesen, verlief die EAE bei unseren Versuchstieren monophasisch. Alle unsere Versuchstiere erreichten in unserer Schweregradeinteilung mindestens Grad 3, der Mittelwert lag bei 3,2. Den Beginn der klinischen EAE - Symptomatik können wir im Mittel mit 12,4 Tagen post inoculationem angeben (Tab. 2).

Aufgrund der deutlichen klinischen Symptomatik begnügten wir uns mit der histologischen Untersuchung des ZNS von 4 Tieren.

Tab. 2 Unterschiedliche Encephalitogenität des A1 - Proteins von Rind und Meerschweinchen bei Lewis - Ratten

Antigen	Zahl d. Tiere	Tiere mit EAE/ Versuchstiere	EAE-Schweregrad (0 - 4)	Beginn d. Symptome (d)
A1-Protein vom Rind + CFA	15	0/15	0^{+}	--
A1-Protein vom Meerschweinchen + CFA	88	88/88	$\bar{x}$ $3,2^{++}$	$\bar{x}$ 12,4
nur CFA	22	0/22	0	--

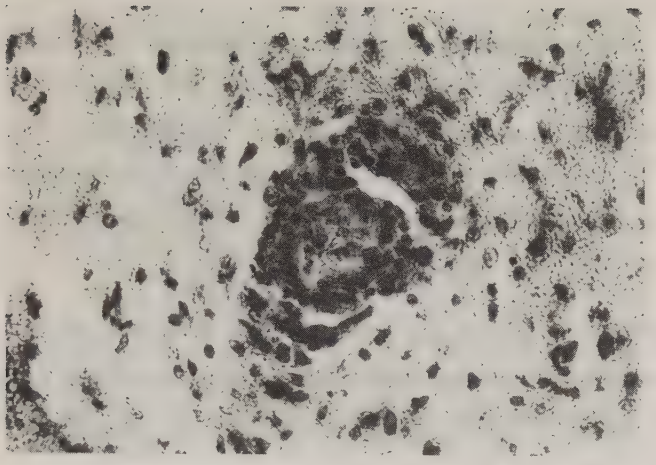
$^{+}$ Histopathologische Veränderungen des ZNS: 0/5

$^{++}$ " " " " : 4/4

Bei allen 4 Ratten konnte auch histologisch eine schwere EAE diagnostiziert werden (Abb. 4).

Im Gegensatz zu den Tieren, die mit A1 - Protein sensibilisiert wurden, konnten wir bei den 22 Kontrolltieren, welche ein Injektionsgemisch ohne basisches Myelinprotein erhielten,

A)



B)

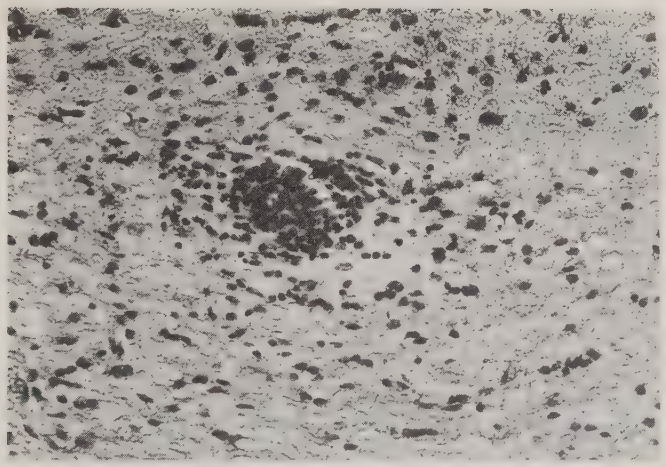
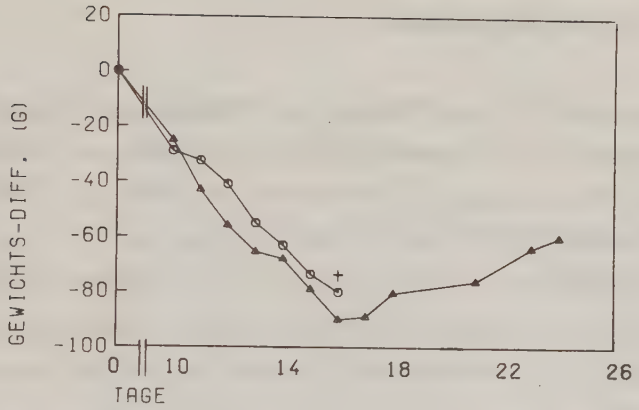


Abb. 4 Typische perivaskuläre entzündliche Infiltrate bei einer aktiven EAE
A) Gehirn, x 540, Hämatoxylin - Eosin
B) Rückenmark, x 340, Hämatoxylin - Eosin

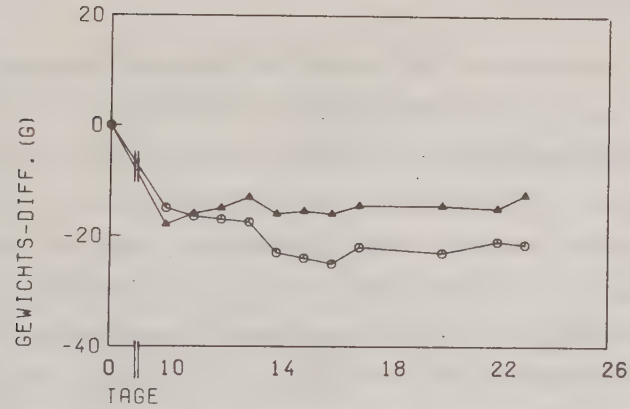
keinerlei neurologische Ausfallserscheinungen erkennen. Lediglich eine mäßige Gewichtsreduktion und ein Anschwellen der Injektionsstellen, eine Reaktion auf das CFA, waren bei diesen Ratten festzustellen. Bleibende Gelenkversteifungen bei Tieren beider Versuchskollektive waren über das Versuchsende hinaus zu diagnostizieren und sind als Adjuvansarthritis in der Literatur bekannt geworden (83, 90).

Die Abbildung 5 bringt ein Beispiel für eine an aktiver EAE erkrankte Lewis - Ratte. Abbildung 6 zeigt in einem Gewichts- und Krankheitsprotokoll den Verlauf der EAE bzw. das Verhalten der Tiere nach Gabe von CFA.

Abb. 5 Lewis - Ratte, 14 Tage nach Verabreichung von 50 µg Meerschweinchen - A1 - Protein und CFA
Symptome: Gewichtsverlust von ca. 100 g (30 % des Ausgangsgewichtes), Lähmung von Schwanz und Hinterbeinen, kot - und urinverschmiertes Fell, Hämaturie.



A)



B)

Abb. 6 A) Beispiel für die Gewichtsänderung bei aktiver EAE
Klinische Symptomatik vom 11. - 16. Tag p. i.
nachweisbar. Eine Ratte starb am 16. Tag.
B) Kontrollversuch: Tiere wurden nur mit CFA behandelt.
Männliche Lewis - Ratten, ca. 4 Monate alt.

5.3 Passive EAE

5.3.1 Einfluß der Zellzahl

In Versuchsreihen, in denen wir zwischen 0,14 und 5 x 10^8 Zellen sensibilisierter Spender pro Tier übertrugen, ermittelten wir eine Mindestmenge an Lymphozyten, die nötig ist, um in einem Großteil der Fälle eine EAE zu erzielen. Wir stellten fest, daß Zellmengen kleiner als 2 x 10^8 nur selten ausreichen, eine klinische Symptomatik in den Empfängern hervorzurufen, wohingegen eine größere Anzahl transferiert wurde, erkrankten über 90 % der Ratten (Tab. 3). Der mittlere Schweregrad der EAE bei diesen Tieren lag mit 2,5 unter jenem der Ratten mit aktiver EAE bei 3,2.

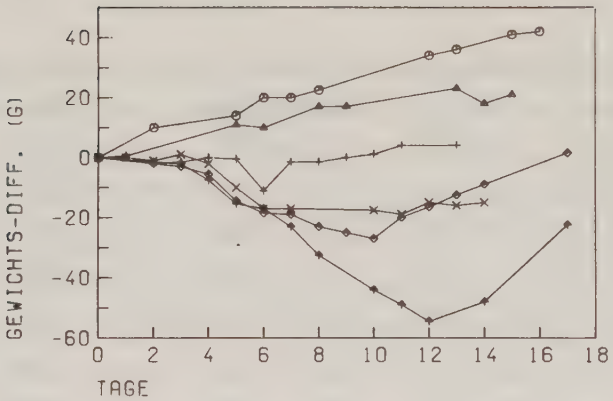
Nach dem Zelltransfer erkrankten die Empfänger zwischen dem 3. - 7. Tag, bei einem Mittelwert von 5,1 Tagen. Vom Zeitpunkt der Spenderimmunisierung gerechnet sind dies 14,2 Tage und damit nahezu 2 Tage mehr als zum Ausbruch der aktiven Erkrankung. Wie die Tabelle 3 zeigt, unterschied sich der mittlere Schweregrad bei den erkrankten Tieren nur geringfügig, gleich ob wir 2 oder 5 x 10^8 Zellen übertrugen. Tetraplegien, Hämaturien und Todesfälle konnten wir nicht beobachten. Abbildung 7 demonstriert Änderungen des Gewichts bei passiver EAE in Abhängigkeit von den übertragenen Zellen.

Um auszuschließen, daß es sich bei den Krankheitssymptomen um einen unspezifischen Effekt handelt, führten wir gleichzeitig auch Kontrollversuche aus, in denen wir die Lymphozyten von

Tab. 3 Versuche zur passiven EAE bei Lewis - Ratten

Behandlung der Zell spender	übertragene Zellen ($\times 10^8$)	erkrankte Tiere/ Versuchstiere (%)	EAE-Schweregrad (0 - 4) $\bar{x}$
A1 + CFA	0,14 - 1,0	1/19 (5,3)	0,11
	1,1 - 2,0	2/15 (13,3)	0,27
	2,1 - 3,0	25/26 (96,2)	2,5
	3,1 - 4,0	32/35 (91,4)	2,43
	4,1 - 5,0	6/6 (100)	2,83
	2,1 - 5,0	63/67 (94)	
CFA	2,1 - 3,0	0/8	
	3,1 - 4,0	0/4	
	4,1 - 5,0	0/4[+]	
	2,1 - 5,0	0/16	

[+] Histopathologische Veränderungen im ZNS: 0/2



▲——▲ 2,0 x 10^7 Zellen (4 Ratten)
⊙——⊙ 3,5 x 10^7 Zellen (2 Ratten)
+——+ 7,0 x 10^7 Zellen (5 Ratten)
×——× 1,4 x 10^8 Zellen
◇——◇ 2,7 x 10^8 Zellen
◆——◆ 4,0 x 10^8 Zellen

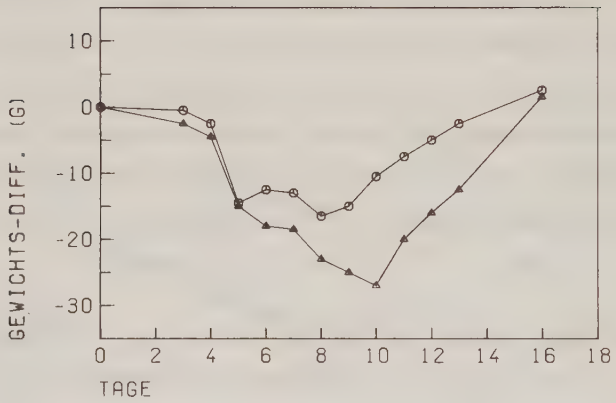
Abb. 7 Gewichtsverlaufskurven von Ratten, auf die verschiedene Mengen von A1 - Protein - sensibilisierten Lymphozyten übertragen wurden.
Die drei oberen Kurven sind Resultierende aus dem Gewichtsverlauf mehrerer Tiere (...). Die restlichen drei Kurven repräsentieren jeweils Einzeltiere, die alle erkrankt waren (EAE - Schweregrad 2 bzw. 3).

nur mit CFA behandelten Spendern übertrugen. In keinem der 16 Fälle, in denen die Empfänger 2,0 - 5,0 x 10^8 Zellen erhielten, konnten klinische Symptome ähnlich denen bei der passiven EAE beobachtet werden. Die histologische Untersuchung von 2 Ratten aus dieser Gruppe konnte keinerlei pathologische Veränderungen im ZNS dieser Tiere erbringen (siehe Tab. 3).

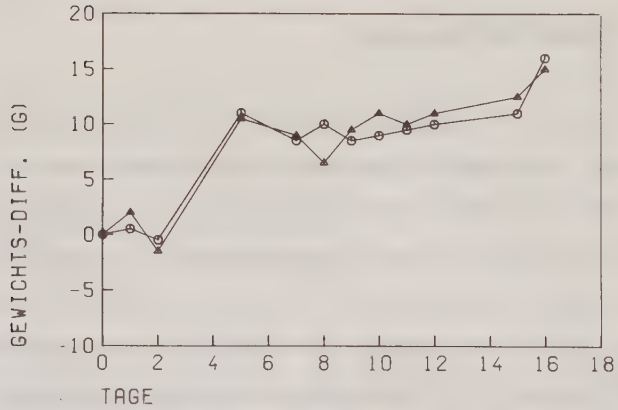
In Abbildung 8 sehen wir in einer Grafik den Krankheitsverlauf einer passiven EAE im Vergleich zu Tieren, die nur unspezifisch stimulierte Zellen (CFA) erhielten.

5.3.2 Motilitätsänderungen

Um bei Ratten mit nur diskreten Zeichen einer EAE die Bewegungsarmut zu objektivieren, führten wir Versuche mit dem Animex Activity Meter durch (19). Abbildung 9 zeigt Veränderungen in den Grob- und Feinbewegungen bei einer weiblichen Lewis - Ratte, auf die 5 x 10^8 Zellen von sensibilisierten Spendern übertragen wurden. Vor dem Zelltransfer wurden etwa 30 000 Fein- und 8 000 Grobbewegungen pro Tag registriert, danach beobachteten wir anfänglich eine leichte Aktivitätssteigerung. Einen Tag bevor wir die ersten Zeichen von Lähmungen diagnostizieren konnten, nahm jedoch die Motilität des Tieres signifikant ab und stieg dann parallel zum Verschwinden der Paresen nach einer kurzdauernden Hyperaktivitätsperiode wieder auf die Ausgangswerte an. In Abbildung 10 sehen wir vom glei-



A)



B)

Abb. 8 A) Krankheitsverlauf einer passiven EAE in Bezug auf die Gewichtsveränderungen
übertragene Zellen: $2,7 \times 10^8$
klinische Symptomatik vom 5. - 10. Tag
B) Kontrollversuch mit Lymphozyten von mit CFA behandelten Tieren
übertragene Zellen: $2,4 \times 10^8$
weibliche Lewis - Ratten, ca. 3 Monate alt.

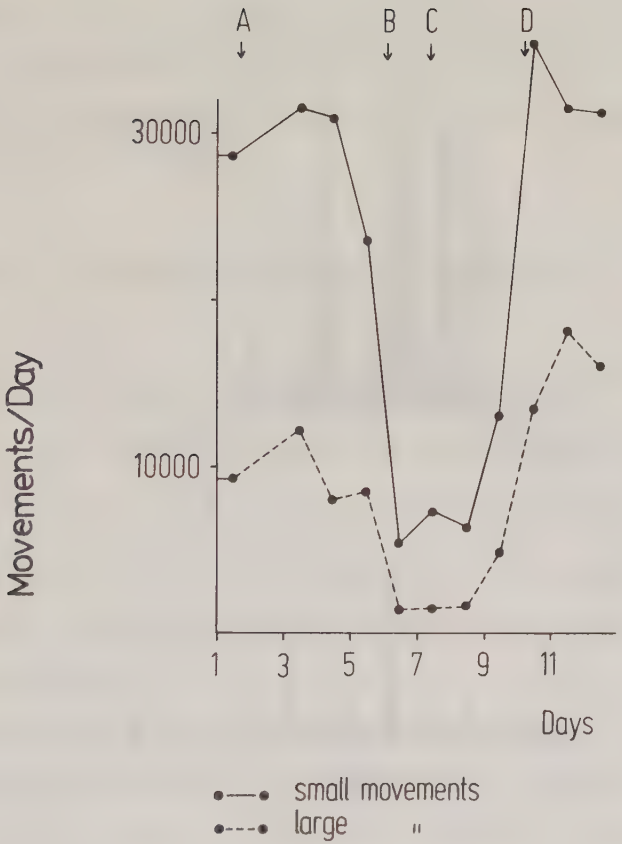


Abb. 9 Änderung der Aktivität vor und nach Transfer einer EAE durch Lymphozyten (weibliche Lewis - Ratte)
A: Zeitpunkt der Zellübertragung
B: Lähmung des Schwanzes
C: Lähmung der Hinterbeine
D: Rückgang der Lähmungserscheinungen

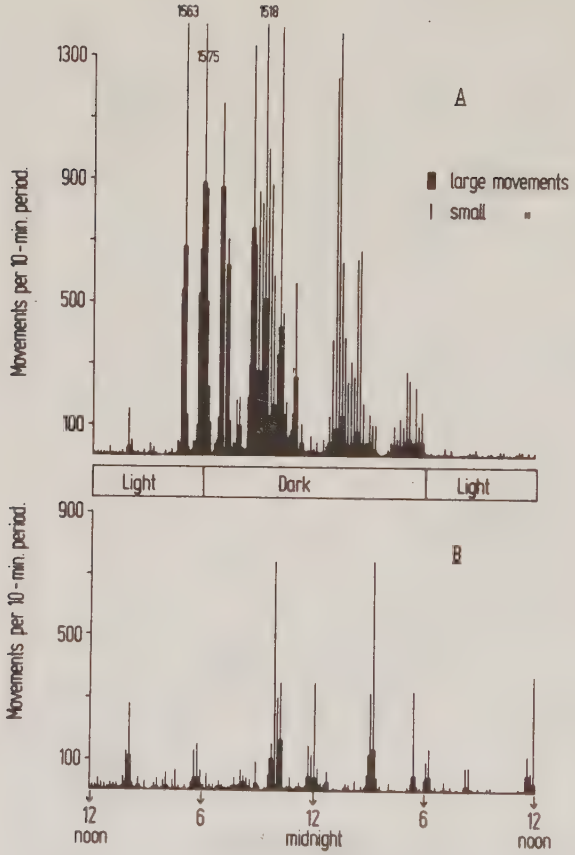


Abb. 10 Aktivitätsprofil im Laufe von 24 Stunden
A) Normale weibliche Lewis - Ratte
B) Das gleiche Tier 5 Tage nach Transfer einer EAE durch Lymphozyten

chen Tier Beispiele der Bewegungstagesprofile vor und nach Zelltransfer.

Neben der Gewichtsabnahme, die als das früheste Zeichen der EAE gilt, kann man vielleicht in subklinisch verlaufenden Fällen einer passiven EAE die Erkrankung mit diesem Bewegungskäfig objektivieren.

5.3.3 Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten

Als Voraussetzung für die geplanten Radioantigensuizidversuche bestimmten wir über direkte Röntgenbestrahlung die Dosis, die notwendig ist, damit die sensibilisierten Lymphozyten die passive EAE nicht mehr transferieren können. Nur wenn die ermittelte Dosis mit der Dosis, die im Radioantigensuizid verabreicht wird, übereinstimmt bzw. geringer ist, besteht begründete Hoffnung, daß der Radioantigensuizid erfolgreich sein kann.

Alle Kontrolltiere erkrankten klinisch mit dem Schweregrad 3 und erbrachten damit den Beweis, daß die Inkubation der Zellen bei $4^{o}C$ über 20 Stunden keinen negativen Einfluß auf den Transfer der passiven EAE hat.

Die Tiere, die Lymphozyten erhielten, die mit 50, 100 und 200 rad vorbestrahlt wurden, erkrankten ebenfalls alle. Auch bei ihnen war durchwegs der EAE - Schweregrad 3 zu diagnostizieren. Alle restlichen Tiere, auf die mit 400, 600, 800 und

1000 rad vorbestrahlte Zellen übertragen wurden, blieben bis zu ihrer Tötung am 8. Tag klinisch unauffällig (Tab. 4).

Wir wählten den 8. Tag als Versuchsende, da in unseren bisherigen Experimenten kein Tier nach dem 7. Tag noch eine passive EAE entwickelte, und man daher mit einiger Sicherheit sagen kann, daß die am 8. Tag nicht erkrankten Tiere auch in der Folge keine EAE - Symptome aufgewiesen hätten.

Die Histologie des ZNS aller Tiere aus diesen Bestrahlungsversuchen erbrachte mit dem klinischen Bild weitgehend übereinstimmende Ergebnisse. Bei allen Kontrolltieren und bei jenen Ratten, die die Zellen erhielten, die mit 200 rad und weniger vorbestrahlt waren, wurde eine histologische EAE mittleren Schweregrades gefunden, wobei sich die entzündlichen Infiltrate über das gesamte ZNS und die Cauda equina mit einem überwiegenden Befall des Rückenmarks erstreckten. Von jenen 8 Ratten, auf die die mit höherer Dosis bestrahlten Lymphozyten transferiert wurden, waren 3 histologisch ohne pathologischen Befund, die restlichen hatten nur einige wenige Herde, die sich ausschließlich im Großhirn bzw. in der Cauda equina befanden.

5.4 Lymphozyten mit A1 - spezifischen Rezeptoren

Mit Lymphozyten von gegen A1 - Protein sensibilisierten Ratten vom 9. Tag post injectionem, also dem üblichen Zeitpunkt des Zelltransfers, wurden 6 Versuche durchgeführt (Tab. 5). Im

Tab. 4 In vitro - Bestrahlung sensibilisierter Lymphozyten, die am 9. Tag nach Behandlung der Spendertiere mit A1 - Protein und CFA entnommen wurden. Übertragung von 2,2 - 2,5 x 10^8 Zellen pro Tier nach Inkubationsdauer von 20 Stunden bei $4^{\circ}C$.

Versuchs-gruppe	Strahlendosis (rad)	Inkubation (20 h)	erkrankte Tiere/ Versuchstiere
1	-	-	2/2
2	-	+	8/8
3	50	+	2/2
4	100	+	2/2
5	200	+	2/2
6	400	+	0/2
7	600	+	0/2
8	800	+	0/2
9	1000	+	0/2

Mittel waren 1,8 % der ausgezählten Zellen nach unserer Definition radioaktiv markiert. Es handelte sich hierbei vorwiegend um kleine Lymphozyten, aber auch große Lymphozyten und Blastzellen wurden in geringer Zahl gefunden.

Tab. 5 Autoradiografie von A1 - Protein sensibilisierten Zellen

Versuch	gezählte Zellen	markierte Zellen	%	Proteinmenge (µg) pro Inkubat	spez. Akt. (µCi/µg)
A1 + CFA					
1	2765	66	2,4	0,72	41
2	2250	41	1,8	0,49	38
3	7031	162	2,3	0,08	122
4	6970	124	1,8	0,08	122
5	6192	74	1,2	0,05	312
6	6387	91	1,4	0,05	312
	31595	558	1,8 ± 0,6		
CFA					
1	1500	4	0,27	0,49	38
2	8559	8	0,1	0,05	312
	10059	12	0,12		

Proteinmengen von 80 - 720 ng/0,5 ml und spezifische Aktivitäten von 41 - 122 µCi/µg brachten in etwa übereinstimmende Resultate mit einem Mittelwert von 2,06 %. Nur die beiden letzten Versuche in der Tabelle 5 mit 50 ng Protein im Ansatz und der spezifischen Aktivität von 312 µCi/µg fielen ebenso wie der gleichzeitig durchgeführte CFA - Kontrollversuch Nr. 2 aus der Reihe. Trotzdem kann man im Vergleich sagen, daß in den Kontrollen 10 x weniger Zellen markiert sind als in den EAE - Versuchen. Beispiele für markierte Zellen zeigt die Abbildung 11.

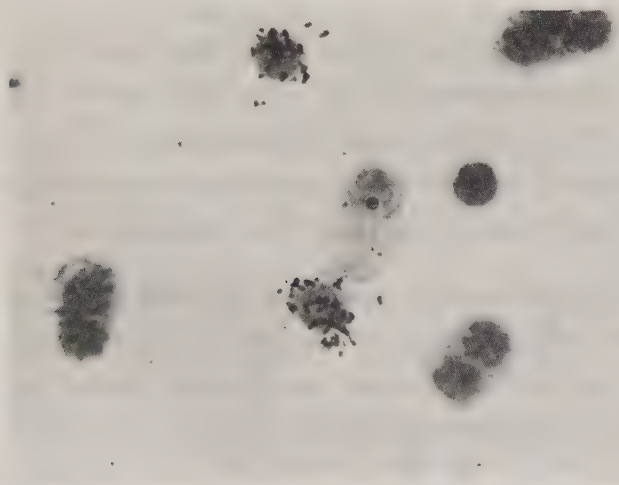


Abb. 11 Autoradiografische Darstellung gegen A1 - Protein sensibilisierter Lymphozyten.
Die Zellen wurden am 9. Tag nach Injektion von A1/CFA entnommen und mit ^{125}J - A1 - Protein inkubiert.
Fotoemulsion: Ilford K2, Expositionsdauer: 8 Tage,
Giemsa - Färbung

5.5 Radioantigensuizidversuche mit sensibilisierten Zellen

In acht Versuchen übertrugen wir auf insgesamt 12 Tiere zwischen 2,6 und 4,0 x 10^8 Lymphozyten, die vorher 30 Minuten lang mit Aktivitäten von 48,16 - 417,9 µCi und A1 - Proteinmengen von 0,34 - 1,8 µg inkubiert, dann 3 x gewaschen und mit der nunmehr wahrscheinlich zellgebundenen Restaktivität nochmals für 14 - 17 Stunden inkubiert wurden, um eine Zerstörung durch die Strahlung zu ermöglichen, bevor die Zellen in den Empfängerorganismus gelangen. Im Verlauf unserer Versuche wurden zwar nur 9 von 12 Ratten klinisch krank, alle hatten jedoch in Gehirn und Rückenmark zahlreiche entzündliche Infiltrate. Um zu zeigen, daß die Zellen nicht schon aufgrund der langen Inkubationsdauer in vitro zerstört werden, inkubierten wir in Kontrollversuchen Lymphozyten mit ^{127}J - A1. Von 8 Tieren aus dieser Gruppe wiesen sieben klinische Symptome auf, und alle waren histologisch deutlich positiv.

Eine weitere Kontrollgruppe erhielt im üblichen Verfahren die Zellen direkt nach Entnahme vom Spendertier und Aufbereitung infundiert. Auch hier erkrankten von 8 Ratten sieben. Die einzige Ausnahme wies auch histologisch nur einen fraglichen Herd auf. Anzumerken ist, daß von den klinisch nicht erkrankten Tieren aus allen Experimenten allein vier aus dem Versuch 8 stammen (Tab. 6).

Tabelle 6 Radioantigensuizidversuche mit A1 - Protein sensibilisierten Lymphozyten von Lewis - Ratten

Versuchs-Nr. +	Übertragene Zellen ($\times 10^8$)	Aktivität (μCi) pro Inkubat	Protein (μg)	Inkubationsdauer (h)	Aktivität nach Waschen (μCi)	erkrankte T./ Versuchstiere	Schweregrad (0 - 4)	Histologie (Zahl der Foci im ZNS)
Inkubation mit ^{125}J - A1 - Protein								
1	3	48,2	0,34	17	0,73	1/1	3	14
2	3,2	48,2	0,34	14	2,92	3/3	3;3;3	12; 9;35
3	3,8	184,7	1,5	16	15,4	1/1	2,5	143
4	3,7	184,7	1,5	16	11,4	2/2	2,5;2,5	97;99
5	4,0	339	1,8	16	68,5	1/1	3	109
6	2,8	339	1,8	16	60	0/1	0	128
7	2,9	417,9	1,5	16	74,3	1/1	2	77
8	2,6	417,9	1,5	16	32	0/2	0;0	66;23
Inkubation mit ^{127}J - A1 - Protein								
1	3		0,34	17		1/1	3	80
2	3,2		0,34	14		1/1	3	51
3	3,8		1,5	16		1/1	3	151
4	3,7		1,5	16		1/1	3	102
5	4,0		1,8	16		1/1	3	187
6	2,8		1,8	16		1/1	3	144
7	2,9		1,5	16		1/1	1,5	70
8	2,6		1,5	16		0/1	0	7
Sofortige Übertragung								
1	3					1/1	3	33
2	3,2					1/1	3	37
3	3,8					1/1	3	312
4	3,7					1/1	3	80
5	4,0					1/1	3	210
6	2,8					1/1	2,5	205
7	2,9					1/1	3	2
8	2,6					0/1	0	(1)

+ Gleiche Versuchsnummern bedeuten, daß die Tiere aus dem gleichen Wurf und dem gleichen Experiment stammen.

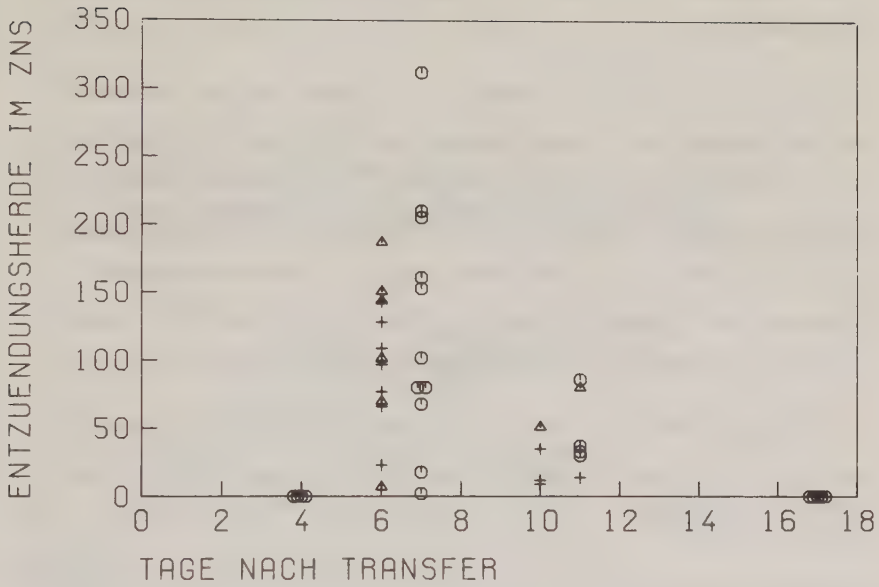
5.6 Quantifizierung der histopathologischen Veränderungen bei passiver EAE

Die histologische Untersuchung ergab mit einer Ausnahme bei allen Tieren, die zwischen dem 6. und 11. Tag nach Übertragung A1 - sensibilisierter Zellen getötet wurden, positive Resultate, d. h. lymphozytäre, perivaskuläre Infiltrate im ZNS der Ratten. Die eine oben genannte Ausnahme zeigte auch klinisch keinerlei Zeichen einer EAE. Bei den Tieren, die am 4. Tag nach Transfer bzw. am 17. Tag getötet wurden, waren keine oder keine Herde mehr nachzuweisen (Abb. 12).

Die 4 Ratten, die am 4. Tag getötet wurden, stammten aus einem Versuch mit insgesamt 9 Tieren, von denen die 5 Überlebenden am nächsten Tag alle klinische Symptome der EAE zeigten.

Der histologische Verlauf der passiven EAE beginnt also anscheinend gleichzeitig oder zumindest ohne großen zeitlichen Abstand mit dem Auftreten der Lähmungserscheinungen. Zum Zeitpunkt der akuten Erkrankung finden wir dann auch die meisten Infiltrate im ZNS. Nach Rekonvaleszenz der Ratten werden die Foci in Gehirn und Rückenmark wieder weniger. Am 17. Tag waren keine mehr im ZNS der 5 Tiere, die alle eine EAE des Schweregrades 3 durchgemacht haben, zu verifizieren.

Vier Tiere aus dem histologisch untersuchten Kollektiv hatten keinerlei klinische Zeichen, dennoch fand man bei ihnen zwischen 7 und 128 Entzündungsherde im ZNS.



⏲ Empfänger von A1 - Protein sensibilisierten Lymphozyten direkt nach deren Aufbereitung

✦ Empfänger von Lymphozyten, die mit ^{125}J - A1 - Protein inkubiert waren

✦ Empfänger von Lymphozyten, die mit ^{127}J - A1 - Protein inkubiert waren

Abb. 12 Anzahl der histologisch nachgewiesenen Entzündungsherde in Gehirn und Rückenmark von Lewis - Ratten in Abhängigkeit zum Zeitpunkt nach Transfer von A1 - Protein sensibilisierten Lymphozyten

Für Erkrankungen des Schweregrads 3 waren zwischen 2 und 312 Foci verantwortlich, was wohl nur mit deren Lokalisation zu erklären ist.

Anzumerken ist, daß ein Großteil der Tiere, die Infiltrate im ZNS hatten, auch einige wenige Herde in der Cauda equina bzw. im Nervus ischiadicus aufwiesen. Diese Ratten haben also neben der dominierenden EAE auch eine mäßige experimentelle allergische Neuritis (EAN) erlitten, was wohl auf die Ähnlichkeit bzw. Identität des A1 - Proteins mit dem P1 - Protein des peripheren Nervensystems zurückzuführen ist.

An sonstigen inneren Organen der EAE - Ratten, wie Lunge, Leber, Milz und Niere, waren keine pathologischen Veränderungen festzustellen.

Das Zentralnervensystem jener zwei untersuchten Tiere aus der Kontrollgruppe, die Zellen von nur mit CFA behandelten Spendern erhielten, war histologisch völlig unauffällig.

Wie aus den Symbolen der Abbildung 12 zu entnehmen ist, sind in den oben berichteten Ergebnissen auch alle Tiere aufgeführt, die im Rahmen des Radioantigensuizids bzw. seiner Kontrollen verwendet wurden. Wir taten dies, da die Ergebnisse aus Tabelle 6 nicht signifikant verschieden sind (Rank - Test).

In Tabelle 7 ist die Histologie der 28 Tiere aus den Radioantigensuizidversuchen nochmals extra aufgelistet. Zwar ist der Mittelwert bei den einzelnen Gruppen sehr unterschiedlich,

doch ist die Anzahl der Herde bei den Einzeltieren, wie schon erwähnt, nicht signifikant verschieden.

Tab. 7 Histologische Auswertung des Zentralnervensystems der Ratten aus den Radioantigensuizidversuchen

	Anzahl der Entzündungsherde im ZNS ($\bar{x}$)	
	6. - 7. Tag nach Zelltransfer	10. - 11. Tag nach Zelltransfer
sofortige Übertragung	135 (6) +	35 (2)
Inkubation mit ^{127}J - A1	110 (6)	65 (2)
Inkubation mit ^{125}J - A1	93 (8)	17 (4)

+ Zahl der Versuchstiere

6. D I S K U S S I O N

6.1 Aktive EAE

6.1.1 Klinik

Obwohl Meerschweinchen des Stammes 13 einen nach unseren Erfahrungen heftigeren und häufig fatal endenden Verlauf der experimentellen allergischen Encephalomyelitis zeigen, ist auch die Lewis - Ratte äußerst anfällig für diese Autoimmunerkrankung. Wie auch von Paterson (63) beschrieben, trat bei unseren Tieren in allen Fällen ein immer wieder nach dem gleichen Schema ablaufendes Geschehen mit Gewichtsverlust, Bewegungsarmut, Schwanzlähmung und Lähmung der hinteren Extremitäten ein. Allerdings können wir Patersons hohe Mortalitätsrate nicht bestätigen. Bei uns blieben verendete Tiere die Ausnahme. Genau wie in seinen Versuchen ist auch in unseren Experimenten wahrscheinlich eine aufsteigende Infektion der Harnwege mit Makrohämaturie der direkte Grund für den Tod der Ratten.

6.1.2 Pathophysiologie

Der Beginn der EAE wird begleitet durch eine erhebliche Zunahme der cerebralen Gefäßpermeabilität als Folge der zellulären Läsionen. Wie Leibowitz et al. (39) mit Hilfe von ^{131}J - Al-

bumin nachwiesen, besteht eine enge Beziehung zwischen dem Ausmaß des Ödems und den klinischen Symptomen, so daß es als der Hauptfaktor bei der Entwicklung der Lähmungen angesehen werden darf.

Zu dem gleichen Ergebnis kommt auch Paterson (65). Er sieht den Pathomechanismus der Ödembildung in einer Fibrinablagerung, fibrinolytischen Aktivität und in deren Folge der Spaltung biologisch aktiver Polypeptide, von denen wiederum bekannt ist, daß sie die Gefäßpermeabilität weiter steigern und die Transsudation von Flüssigkeit fördern können.

Levine et al. (41) stellten bei an EAE erkrankten Lewis - Ratten eine ödembedingte Schwellung des Rückenmarks jedoch nicht des Gehirns der Tiere fest. Dies ist eine Erklärung für die bei kleinen Nagetieren stereotyp ablaufenden Lähmungserscheinungen von Schwanz und Hinterbeinen, wesentlich seltener jedoch der vorderen Extremitäten.

Die Ödemtheorie steht auch im Einklang damit, daß die zellulären Infiltrate auch dann noch im ZNS der Tiere zu finden sind, wenn die relativ kurzdauernden Symptome der EAE bereits abgeklungen sind.

6.2 Was ist bei der Übertragung der passiven EAE zu beachten?

6.2.1 Einfluß des Entnahmeortes, des Zeitpunktes und des Übertragungsweges

Nach Paterson et al. (60) werden zur Übertragung einer EAE intakte lebende Zellen benötigt. In ihrem Versuch erhitzten sie sensibilisierte Lymphozyten auf 56°C, worauf sie mit diesen Zellen keine EAE mehr übertragen konnten.

Paterson (61) betont ebenfalls die Notwendigkeit von Lymphozyten aus Lymphknoten. Trotz aller Anstrengung ist es ihm nicht gelungen, die EAE mit Milzzellen oder peritonäalen Makrophagen zu transferieren.

Alternativ hierzu beschreiben Levine et al. (40) den Transfer mit Milzzellen und mit Blut (43), sowie Whitehouse et al. (89) mit Lymphozyten aus dem Ductus thoracicus. In den beiden erstgenannten Fällen wurden allerdings noch spezielle Manipulationen am Empfängertier vorgenommen, wie Adrenalektomie bzw. künstliche Verletzungsherde im Gehirn der Tiere durch Hitzesonden.

Der optimale Zeitpunkt für die Lymphknotenentnahme bei sensibilisierten Tieren zur Übertragung der passiven EAE hat sich mit dem 9. Tag herausgestellt, wenngleich wir auch Zellen vom 8. und 10. Tag in unseren Versuchen verwendeten und hierbei keinen signifikanten Unterschied registrieren konnten.

Die Applikationsmethode der Wahl bei der Übertragung der EAE ist die intravenöse Verabreichung der Zellsuspension (42, 61). Sie ist relativ leicht durchzuführen und bietet den Zellen neben der intracerebralen Injektion die beste Möglichkeit schnell und ungeschädigt an ihren Bestimmungsort zu kommen.

6.2.2 Synergismus zwischen Spender- und Empfängerlymphozyten

Hier stellt sich nun die Frage, ob die Spenderzellen selbst die Läsionen verursachen oder ob die Erkrankung erst durch eine Interaktion zwischen Spender- und Empfängerlymphozyten ausgelöst wird. Für letzteres spricht die Tatsache, die sich aus unseren eigenen Experimenten ergeben hat, nämlich, daß vom Zeitpunkt der Sensibilisierung bis zum Ausbruch der Erkrankung bei der aktiven EAE im Mittel 12,4 , bei der passiven EAE jedoch 14,2 Tage vergehen. Vielleicht sind diese zwei Tage Verzögerung damit zu erklären, daß gewisse "Informationen" von Spender- zu Empfängerzellen weitergegeben werden müssen, die erst dann eine EAE ermöglichen.

6.2.3 Mindestzellzahl

Soweit uns bekannt ist, gibt es keine eindeutigen Angaben über eine Mindestzelldosis, die notwendig ist, um eine EAE in der Mehrzahl der Fälle transferieren zu können. Paterson schreibt zwar 1966 (61), daß es ihm gelang,mit nur 2×10^7 Zellen die

Krankheit zu übertragen. Es geht aus diesen Angaben allerdings nicht hervor, ob dies regelmäßig oder einmalig der Fall war. Überraschenderweise gelang es ihm in einer im Jahre 1975 veröffentlichten Arbeit (64) nämlich in keinem von 42 Versuchen mit Lewis - Ratten, eine klinische EAE mit 4,43 - 8,8 x 10^8 Zellen zu übertragen.

In unseren eigenen Versuchen konnten wir einen "Schwellenwert" für die Induktion der passiven EAE herausarbeiten (Tab. 3). Nur 3 Tiere aus 34, die weniger als 2 x 10^8 Lymphozyten erhielten, erkrankten, wohingegen 63 von 67 aus Übertragungsversuchen mit mehr als 2 x 10^8 Zellen die klinischen Symptome der EAE aufwiesen. Geschlechtsunterschiede wurden im Gegensatz zu anderen Autoren (61) nicht beobachtet, obwohl auch wir als Empfänger meist weibliche Tiere verwendeten.

Zu unserer Überraschung stellten wir fest, daß wir den EAE - Schweregrad mit Zellmengen, die weit überschwellig lagen, kaum gegenüber knapp überschwelligen Zellzahlen steigern konnten. Dies könnte bedeuten, daß nur eine gewisse Anzahl sensibilisierter Spenderzellen, sogenannte Effektorzellen, notwendig sind, um im Empfänger den EAE - Prozeß auszulösen.

Retrospektiv gesehen liegen die meisten Angaben zur nötigen Zellmenge bei passiver EAE in der Lewis - Ratte über unserer Mindestmenge (42, 44, 56, 57, 71, 89).

Für unseren Radioantigensuizidversuch war es von Bedeutung, daß wir mit einiger Sicherheit mit der Lymphozytenzahl arbei-

teten, die gerade in der Lage war, die passive EAE zu induzieren, die aber andererseits mit unserer verwendeten Strahlendosis auch leicht auf einen unterschwelligen und zur EAE - Auslösung nicht ausreichenden Wert zu reduzieren sein mußte.

6.2.4 Bedeutung der Adjuvansarthritis

Die von Whitehouse et al. (89) beobachtete, übertragbare Adjuvansarthritis spielte in unseren Experimenten keine erkennbare Rolle und konnte auch in den Kontrollversuchen mit CFA - Lymphozyten nicht registriert werden. Aus der Abbildung 8 B) ist nur vom 5. bis zum 15. Versuchstag ein Konstantbleiben des Körpergewichtes anzumerken. In keinem Fall waren entzündliche Gelenkerscheinungen bzw. sonstige Symptome an Ohren oder Schwanz aufgetreten. Im Unterschied zu den genannten Autoren arbeiteten wir mit Lymphozyten aus Lymphknoten und sie mit Zellen aus dem kanülierten Ductus thoracicus CFA - behandelter Tiere.

Auch die histologische Untersuchung, die bei 2 Tieren aus dieser CFA - Kontrollgruppe durchgeführt wurde, erbrachte keinerlei Besonderheiten von Gehirn, Rückenmark und einigen inneren Organen wie Milz, Leber, Lunge.

6.2.5 Histologie der passiven EAE

6.2.5.1 Unterschiede zur aktiven EAE

Die histologische Inspektion des ZNS der Tiere mit passiver EAE bestätigt die Ergebnisse unserer klinischen Beobachtung. Der mittlere klinische Schweregrad lag bei der passiven EAE mit 2,6 unter dem der aktiven EAE mit 3,2. Dementsprechend wurden histologisch bei den Tieren, die am 6. und 7. Tag nach Zelltransfer, also zum Zeitpunkt der akuten Erkrankung, getötet wurden, im Mittel 112 (2 - 312) entzündliche Infiltrate im ZNS gefunden, während Günther et al. (30) bei der aktiven EAE am 16. Tag nach Inokulation - ebenfalls zum Zeitpunkt der akuten Erkrankung - im Mittel 183 (57 - 307) Herde zählten.

Im Unterschied zur aktiven EAE, bei der das Rückenmark erheblich mehr Infiltrate aufweist als das Gehirn, waren die Foci bei der passiven EAE zwischen beiden ZNS - Abschnitten relativ gleichmäßig verteilt.

In der Morphologie der zellulären Infiltrate waren keinerlei Unterschiede augenfällig. Es handelte sich jeweils um polymorphkernige Leukozyten, Lymphozyten und Histiozyten.

Bemerkenswert ist unserer Ansicht nach auch, daß trotz der Infusion derart hoher Zellmengen an den untersuchten inneren Organen keine Embolien und Infarkte festgestellt werden konnten.

Der Transferversuch, bei dem die Tiere am 4. Tag, noch vor Ausbruch der EAE, getötet wurden und deren ZNS histologisch negativ war, zeigt, daß im Gegensatz zur aktiven EAE (63) zelluläre Infiltrate und klinische Symptome nur durch geringe, wenn überhaupt, Zeitdifferenz getrennt sind.

Bei der passiven EAE kommt es durch die massive einmalige Verabreichung derart vieler sensibilisierter Zellen wahrscheinlich zu einem "Dammbruch" der Blut - Hirn - Schranke, während in der aktiven EAE durch den andauernden Antigenreiz anfangs nur geringe Zellmengen durch die Barriere penetrieren, und erst nach einer gewissen Schwellendosis die klinische Symptomatik auftritt.

6.2.5.2 Korrelation zwischen entzündlichen Infiltraten und der klinischen Symptomatik

Die Frage, ob neurologische Zeichen bei der EAE auch ohne histologisches Korrelat im ZNS auftreten, können wir mit Levine et al. (46) verneinen. Keines unserer Versuchstiere, das eine klinische EAE produziert hatte, war in der darauf folgenden feingeweblichen Untersuchung negativ.

Bisweilen kam es jedoch vor, daß, wie schon erwähnt, nur sehr wenige Herde für massive Lähmungen verantwortlich waren. Hier ist wohl die Lokalisation von entscheidender Bedeutung, was sicherlich auch für jene wenigen Fälle gilt, die trotz nachgewiesener zahlreicher Foci klinisch unauffällig waren.

6.3 Strahlenempfindlichkeit von Lymphozyten

6.3.1 Unterschiede zwischen B - und T - Zellen

Lymphozyten haben sich in Bestrahlungsversuchen an Mensch und Tier als hoch strahlensensibel erwiesen. Trowell registrierte nach in vivo - Bestrahlung mit 150 rad nach 5 Stunden in 50 % der Lymphozyten eine Pyknose (81). In seiner Arbeit aus dem Jahre 1977 beschreibt Order (55) nach Bestrahlung mit 100 rad eine Lymphozytenreduktion im Blut auf 25 % und mit 200 rad sogar auf unter 10 %.

Anhand von in vitro - Bestrahlungsversuchen menschlicher Lymphozyten konnte Prosser (70) eine differenzierte Strahlensensibilität der Lymphozyten erarbeiten. Während nach Röntgenbestrahlung mit 25 rad in seinen Kulturen nach 4 Tagen nur noch ca. 45 % B - Lymphozyten überlebten, waren es bei den T - Zellen noch über 90 %. In den weiteren Experimenten mit höheren Strahlendosen bestätigte sich die höhere Strahlenresistenz der T - Lymphozyten.

Ähnliche Ergebnisse wie mit menschlichen Zellen ergaben sich auch in Bestrahlungsversuchen mit Ratten. Nach Ganzkörperexposition mit 300 rad waren im Blut dieser Tiere einen Tag später nur noch 5 % Lymphozyten nachzuweisen (9).

Neuere Untersuchungen, die sich vor allem mit sensibilisierten Lymphozyten beschäftigen, haben auch bei Tieren eine erhöhte Strahlenresistenz für T - Zellen festgestellt.

Lymphozyten aus dem Ductus thoracicus bzw. der Milz wurden mit der Röntgenröhre bestrahlt. In Kulturen überlebten keine B - Zellen eine Strahlendosis von 300 rad und auch die T - Zell - Population wurde auf 10 % reduziert. Zwischen 5 - 10 % der T - Zellen überstanden allerdings auch Strahlendosen von 1000 rad. In diesen Versuchen von Anderson et al. (5) machten die Autoren die Beobachtung, daß intravenös verabreichte Lymphozyten, die sich normalerweise auf Milz und Lymphknoten verteilen, dies auch nach Exposition mit 1000 rad tun, wenn man sie direkt im Anschluß daran injiziert (primäre Migration), daß dies aber selbst schon bei Strahlendosen von 100 rad unterbleibt, wenn man die bestrahlten Zellen zunächst für einige Stunden in Kultur behält (sekundäre Migration).

Da die Fähigkeit der Lymphozyten, sich auf Milz und Lymphknoten zu verteilen, auf Membraneigenschaften beruhen dürfte (92), lassen die Unterschiede zwischen primärer und sekundärer Migration vermuten, daß die strahlenbedingte Schädigung der Zellmembran erst nach einigen Stunden eingetreten ist.

Diese Beobachtung war in der Folge auch der Grund dafür, daß wir unsere Zellen nach Röntgenbestrahlung bzw. Exposition gegen ^{125}J - Antigen zunächst für etliche Stunden inkubierten, ehe wir sie transferierten.

6.3.2 Erhöhte Strahlenresistenz bei aktivierten Lymphozyten

Anderson et al. fanden aber auch (5), daß aktivierte T - Zellen

im Vergleich zu kleinen Lymphozyten strahlenresistenter sind. Die sekundäre Migration konnte auch mit 1000 rad nicht völlig unterbrochen werden. Als Begründung wurde der hypermetabolische Status dieser Zellen angeführt, der über wirksame Reparaturmechanismen Schutz vor Strahlenschäden bietet.

In einer weiteren Arbeit zu diesem Thema betonen die gleichen Autoren auch die Bedeutung des sofortigen Kontaktes mit dem Antigen (76). Für die Blastzelle der T - Population hätte dies den Vorteil, daß sie sofort den hypermetabolischen Zustand erreichen, während die Gruppe, die erst später mit dem Antigen reagiert, anfangs noch aus kleinen Lymphozyten bestand und damit anfälliger gegenüber dem Interphasetod war, der wahrscheinlich Folge einer zytoplasmatischen Zerstörung ist (81).

Asherson et al. (6) übertrugen in ihrem Versuch, Kontaktsensitivität gegen Oxazolon zu transferieren bzw. zu unterdrücken, ihre Lymphozyten ebenfalls direkt nach Bestrahlung mit 2000 rad und mußten erkennen, daß eine Zerstörung der Immunantwort selbst mit dieser Dosis nicht möglich war. Sie begründeten dies damit, daß die transferierten T - Zellen nicht proliferieren und Effektorzellen für die Kontaktsensitivität sind. Weiterhin vermuteten sie, daß die injizierten T - Zellen infolgedessen mit den T - Zellen des Empfängers zusammenwirken.

6.3.3 Verlust der Encephalitogenität der EAE - Lymphozyten durch Inkubation nach Bestrahlung

Purdy et al. (71) testeten den Effekt der Bestrahlung EAE - sensibilisierter Zellen auf ihre Fähigkeit, die Erkrankung noch zu induzieren. Sie verabreichten Strahlendosen zwischen 200 und 1500 R und transferierten die Zellen sofort im Anschluß. Eine Unterdrückung der passiven EAE sowohl in klinischer als auch histopathologischer Hinsicht erreichten sie erst bei einer Strahlendosis von 800 R und mehr.

In Anbetracht der Ergebnisse von Anderson et al. (5, 76) vollzogen wir den gleichen Versuch nach mit dem Unterschied, daß wir die sensibilisierten Lymphozyten unserer Ratten nach der Bestrahlung noch 20 Stunden bei $4^{o}C$ inkubierten. Der Effekt war, daß wir bereits bei 400 rad keine klinischen Symptome mehr fanden und die histologische Untersuchung teils negativ ausfiel, teils einige wenige Herde erbrachte, die sich uns unerklärlicherweise nur auf das Großhirn und die Cauda equina beschränkten, ohne anscheinend dort neurologischen Schaden anzurichten.

6.4 A1 - bindende Lymphozyten

6.4.1 Verschiedene Nachweismethoden

Bereits 1965 berichteten Rauch et al. (72) über den Nachweis A1 - spezifischer Lymphozyten bei sensibilisierten Meerschwein-

chen. Zwischen 5 - 10 % vorwiegend kleine aber auch mittlere Lymphozyten und gelegentlich Plasmazellen zeigten nach Inkubation mit dem Antigen und darauf folgender Zugabe von mit Fluorescein Isothiocyanat markiertem Anti - A1 - Protein - IgG vom Kaninchen entsprechende Fluoreszenz.

Yung et al. (93) wiesen 1973 mit ^{125}J - A1 spezifische Lymphozyten bei Mensch und Meerschweinchen nach. Meerschweinchen, die mit A1/CFA vorimmunisiert waren, hatten 5 x mehr antigenbindende Lymphozyten als Normaltiere und ca. 20 x mehr als CFA - Kontrolltiere. Die Angaben über die markierten Zellen beziehen sich in dieser Arbeit leider jeweils nur auf einen Lymphknoten und sind somit nicht mit unseren bei den Ratten gefundenen Werten zu vergleichen.

Autoradiografische Versuche mit ^{125}J - Flagellin führten auch Ada et al. (2) mit Milzzellen Flagellin - sensibilisierter Mäuse durch. Vier Tage nach Sensibilisierung war der Anteil der markierbaren Zellen von 0,2 % auf über 1,7 % angestiegen.

Über Menge und Art A1 - spezifischer Zellen bei sensibilisierten Ratten liegen uns keine Daten anderer Autoren vor, so daß wir unser autoradiografisch ermitteltes Ergebnis von 1,8 % markierten Zellen nicht direkt vergleichen können. Gemessen an den oben zitierten Arbeiten liegt dieses Resultat aber unseres Erachtens im Rahmen.

6.4.2 Differenzierung der Zellen

Von weiterer Bedeutung ist die Frage, ob es sich bei den ^{125}J - A1 - markierten Zellen um T - oder B - Lymphozyten handelt.

Die Lymphozyten werden in der Regel in 3 Gruppen eingeteilt: B - Zellen, T - Zellen und sogenannte Null - Zellen, die weder die Charakterisierungseigenschaften von B - noch von T - Zellen haben. Zur Antigenerkennung tragen die B - Zellen auf ihrer Oberfläche Immunglobulin - ähnliche Moleküle (53). Aber auch zumindest für aktivierte T - Zellen sind spezifische Rezeptoren zur Erkennung des Antigens an der Zelloberfläche zu fordern. Ansonsten lassen sich geglückte Radioantigensuizidversuche mit T - Zellen nicht erklären.

Um nun unsere markierten Lymphozyten differenzieren zu können, versuchten wir einen ähnlichen Versuchsaufbau nachzuvollziehen, wie er in der Arbeit von Levinson et al. (47) beschrieben ist. Diese Autoren bestimmten über Inkorporation von ^{3}H - Thymidin und anschließender Rosettierung mit Schafserythrozyten den Anteil proliferierender T - Zellen innerhalb jener Lymphozyten, die sie aus dem Peritonäalexsudat von Meerschweinchen gewonnen haben. Das Antigen, mit dem sie die Proliferation herbeiführten, war das A1 - Protein.

Entsprechende Versuche unsererseits mittels Inkubation der sensibilisierten Rattenlymphozyten mit ^{125}J - A1 und anschließender Rosettierung mit Kaninchen- oder Schafserythro-

zyten scheiterten. In unserem Labor gelang uns die Rosettierung weder durch direkte Verfahren (18, 58), noch durch Koppeln von Anti - T - Zell - Serum oder Protein A von Staphylococcus aureus (23) an Schafserythrozyten mittels der Chromchlorid - Methode (26). Wir konnten aber auch in der Literatur keine Rosettierungsversuche mit Lymphozyten von Ratten entdecken. Immer wurden Zellen von Meerschweinchen oder Mäusen verwendet. Anscheinend nimmt die Ratte unter den Nagetieren in Bezug auf die Reagibilität ihrer Lymphozyten eine gewisse Sonderstellung ein.

Es ist uns deshalb nicht möglich, eigentlich sehr wesentliche Angaben über den Typ der von uns markierten Lymphozyten zu treffen.

6.4.3 Markierte Lymphozyten in den CFA - Kontrollen

6.4.3.1 Kreuzreaktivität zwischen A1 - Protein und mykobakteriellem Antigen

Ein anderes Phänomen zog allerdings unsere Aufmerksamkeit auf sich. Wenn auch 10 x weniger Zellen in den Kontrollversuchen mit CFA markiert waren, so erschien uns dies dennoch eine zu große Zahl. Eine Erklärung hierfür bot die Arbeit von Vandenbark et al. (85), der auf eine Kreuzreaktivität zwischen basischem Myelinprotein, also dem A1 - Protein, und dem mykobakteriellen Antigen hinwies.

6.4.3.2 Suppression der EAE durch CFA - Vorbehandlung

Aus eigenen Versuchen wissen wir, daß wir die aktive EAE bei Lewis - Ratten unterdrücken können, wenn wir diese Tiere mit CFA vorbehandeln. Auch hier wäre eine Kreuzreaktion der beiden Antigene eine plausible Erklärung, da die Suppression der EAE durch vorausgehende Injektion von A1 - Protein bekannt ist (14).

In Experimenten über die notwendige Zeitspanne zwischen CFA - Behandlung und üblicher EAE - Induktion mit A1/CFA fanden wir heraus, daß bereits bei einem neuntägigen Intervall der Schweregrad der Erkrankung deutlich zurückgeht. Vergrößerten wir den Abstand auf 15 Tage, so konnten wir die EAE klinisch völlig unterdrücken. Bei 5 Ratten, die erst 3 Wochen nach CFA - Gabe mit A1/CFA behandelt wurden und keine EAE entwickelten, waren auch die histologischen Befunde negativ. Andere Autoren fanden bei Meerschweinchen zwar auch diese Möglichkeit der Suppression, aber auch in diesen Fällen wurde von entzündlichen Infiltraten im ZNS der Tiere berichtet (38, 50).

Aus dem Erwähnten kann man wohl die hohe Zahl der autoradiografisch markierten Zellen in den CFA - Kontrollversuchen verstehen.

6.5 Radioantigensuizid

6.5.1 Anforderungen an die Eigenschaften eines brauchbaren Isotops

Nach Humphrey et al. (35) müssen an ein radioaktives Isotop für die selektive Zerstörung von Zellen im Radioantigensuizid folgende Anforderungen gestellt werden: a) Es soll sich um einen weichen Betastrahler handeln. b) Die Strahlung muß innerhalb von 5 µm weitgehend absorbiert werden, um Schäden an Nachbarzellen zu verhindern. c) Die Strahlen müssen mindestens eine Eindringtiefe von 1 µm haben, um den schmalen Zytoplasmasaum der Lymphozyten zu durchdringen und den Kern zu erreichen.

In Anbetracht seiner gegenüber ^{3}H relativ kurzen Halbwertszeit von ca. 60 Tagen bietet sich hierfür ^{125}J an, das noch dazu mit der Chloramin T - Methode leicht an das Antigen gekoppelt werden kann (36, 74). Die Radiotoxizität des ^{125}J übersteigt jene von ^{3}H und ^{131}J um den Faktor 12 - 15 (33, 86). Sie ist vor allem für das intranukleäre ^{125}J den starken lokalen Schäden zuzuschreiben, die durch die "Auger - Kaskade" entstehen (10). Dasselbe Geschehen im Zytoplasma ist weniger geeignet, Zellen zu zerstören (33).

^{125}J zerfällt durch Elektroneneinfang auf der K - Schale zu ^{125}Te. Dieser Elektroneneinfang verursacht eine Anregung der Elektronenhülle, die dazu führt, daß Vakanzen der K - Schale aufgefüllt werden. Die in diesem Prozeß freigesetzten Röntgen-

strahlen bewirken den Verlust einer Reihe von Hüllelektronen, was "Auger - Kaskade" genannt wird. Die ausgestrahlten Elektronen werden als Auger - Elektronen bezeichnet.

Pro Zerfall eines ^{125}J - Atoms entstehen so durchschnittlich 10 Elektronen, von denen wiederum 7 eine Initialenergie von 0,4 keV oder weniger haben (33), d. h. deren maximale Reichweite 200 Å ist. Die Energie innerhalb von 5 nm um ein zerfallendes ^{125}J - Atom beträgt ca. 1200 eV. Jedoch kann die maximale Zahl der Auger - Elektronen und inneren Konversionselektronen auf 19 ansteigen, so daß die Energie leicht über 2000 eV in dem genannten Raum sein kann. Man kann deshalb durchaus annehmen, daß in einem genügend kleinen Zielvolumen der Zerfall eines ^{125}J - Atoms mehr Schaden erzeugen kann als der Durchgang eines 5 MeV Alpha - Partikels (34).

6.5.2 Einfluß des Bindungsortes auf die biologische Wirksamkeit ionisierender Strahlung

Warters et al. (87) testeten den Einfluß des Bindungsortes auf die biologische Wirksamkeit ionisierender Strahlen des ^{125}J. In ihren in vitro - Versuchen mit chinesischen Hamsterovarialzellen (CHO) stellten sie die Wirksamkeit der Bindung von ^{125}J - Concanavalin A an der Zelloberfläche jener des Einbaus von ^{125}J - Desoxyuridin in den Zellkern gegenüber (Tab. 8). Um die LD_{50} mit membrangebundenem ^{125}J zu erreichen, sind 19600 Zerfälle pro Zelle notwendig, was einer Strahlendosis

Tab. 8 Einfluß des Bindungsortes auf die biologische Wirksamkeit der ionisierenden Strahlen des ^{125}J +

Bindungsort	LD_{50}		
	Zerfälle / Zelle	Strahlendosis (rad) am Bindungsort	im Zellkern
Zellmembran++	19600	52000	410
Chromatin+++	60	45	45

\+ In vitro - Untersuchungen an chinesischen Hamster - Ovarialzellen (CHO). Mittlerer Zellradius 6,4 µ, Kernradius 3,9 µ. Angaben entnommen aus Warters et al. Cur. Top. Radiat. Res. Q., 12 (1977), 389

++ Bindung von ^{125}J - Concanavalin A

+++ Einbau von ^{125}J - Desoxyuridin

von 52000 rad an der Plasmamembran und 410 rad im Zellkern entspricht. Demgegenüber sind für den gleichen Effekt mit Chromatin - gebundenem ^{125}J nur 60 Zerfälle, was eine Dosis von 45 rad bedeutet, erforderlich. Aus den verschieden hohen Dosen für die LD_{50} ist ersichtlich, daß die Zellmembran nicht

das primär strahlenempfindliche Zielorgan für den strahleninduzierten mitotischen Zelltod ist (87).

Bei direkter Röntgenbestrahlung benötigten Warters et al. für die LD_{50} bei CHO - Zellen 330 rad, was in etwa mit den Ergebnissen aus unseren Bestrahlungsversuchen übereinstimmt.

6.5.3 Strahlendosis in unseren Versuchen

Wenn wir die Zerfälle, die für die CHO - Zellen notwendig sind, um eine LD_{50} zu erzielen, auf unsere Radioantigensuizidversuche beziehen, so ergibt sich aus der wahrscheinlich zellgebundenen Restaktivität nach dem Waschen (siehe Tab. 6) und der Kenntnis der markierten Zellen aus den Autoradiogrammen, daß wir zumindest in den Versuchen 5 mit 8 die 19600 Zerfälle pro Zelle erreichen bzw. überschreiten. Vergleicht man außerdem die Größen von Zell- und Kernradius bei den CHO - Zellen mit denen von Lymphozyten, die einen wesentlich größeren Kern in Relation zur Gesamtzelle haben, so sollte für den gleichen Strahleneffekt eine geringere Zerfallszahl an der Zelloberfläche notwendig sein, um die gleiche Strahlendosis im Kern zu erzielen.

6.5.4 Mögliche Ursachen für das Nichtgelingen unserer Radioantigensuizidversuche

Nachdem wir also davon ausgehen können, daß es unter den Lymphozyten, die die passive EAE übertragen, Zellen gibt, die das radioaktive Antigen anlagern, und außerdem mit einer Strahlendosis arbeiten, die den gewünschten Effekt erbringen müßte, stellt sich die Frage, warum unsere Radioantigensuizidversuche nicht erfolgreich waren.

6.5.4.1 Unterschiede zu erfolgreichen Versuchen anderer Autoren

Aus Tabelle 9 ersehen wir, daß die Erfolgskontrolle der Radioantigensuizidversuche anderer Autoren mit einer Ausnahme nie die Unterdrückung einer Krankheit war, sondern es sich immer um in vitro - Tests wie Antikörperbestimmung, Plaque Tests etc. handelte, die nicht unbedingt einer Ja - Nein - Antwort bedürfen, sondern schon in einer Reduktion der Werte gegenüber dem Normalfall ihren Erfolg haben.

Die erwähnte Ausnahme ist die Arbeit von Ortiz - Ortiz et al. (57). Diese führten einen Radioantigensuizid im Rahmen einer EAE bei Lewis - Ratten durch. Ihr Versuchsaufbau unterschied sich dennoch ganz wesentlich vom unsrigen. Sie entnahmen unsensibilisierte Lymphozyten und inkubierten sie mit ^{125}J - A1. Anschließend übertrugen sie diese Zellen auf thym-

Tab. 9 Versuche zum Radioantigensuizid

Autoren	Jahr	markiertes Antigen	Erfolgskontrolle	T- oder B-Lymphozyten	Versuchstiere
Ada et al (1)	1969	POL	Antikörperbildung	B	Mäuse
Humphrey et al. (35)	1971	KLH,TIGAL, MSH	Antikörperbildung	B	Mäuse
Roelants et al. (73)	1971	MSH	Antikörperbildung	B, T?	Mäuse
Basten et al. (7)	1971	FGG	Antikörperbildung	B, T	Mäuse
Unanue et al. (82)	1971	KLH, HGG	Antigenbindungs-vermögen (ABC)	B	Mäuse Meerschweinchen
Golan et al. (25)	1972	KLH, HGG, BSA	PFC	B	Mäuse
Cooper et al. (12)	1972	POL	Schwellung der Pfoten	T	Mäuse
Pearson et al. (67,68)	1975 1976	N- und C-Peptide von Ferridoxin an BSA gekoppelt	^{3}H - Thymidin - Inkorporation	B, T	Meerschweinchen
Ortiz-Ortiz et al. (57)	1976	A1 der Ratte	Suppression der EAE	B, T	Ratten

POL - polymerisiertes Flagellin, KLH - Keyhole limpet haemocyanin, TIGAL - Polypeptid, MSH - Maia squinado Haemocyanin, FGG - Fowl gamma globulin, HGG - Human gamma globulin, BSA - Bovines Serumalbumin, PFC - Plaque forming cells.

ektomierte und mit 900 R vorbestrahlte Empfänger. Bei diesen versuchten sie dann eine aktive EAE auszulösen mit dem Ergebnis, daß die Erkrankung nicht zum Ausbruch kam.

Im Gegensatz zu unseren Versuchen arbeiteten sie also mit unsensibilisierten Zellen, von denen wir wissen, daß sie wahrscheinlich strahlensensibler sind als aktivierte (5, 76). Außerdem war die Anzahl der mit A1 reagierenden Zellen in diesen Experimenten wesentlich geringer. Die Autoren fanden im Thymus von Lewis - Ratten 8 antigenbindende Lymphozyten und in deren Milz 17 je 100000 ausgezählter Zellen.

Trotzdem lieferte diese Arbeit den Beweis, daß T - Zellen das Antigen anlagern. Offen bleibt die Frage, ob aktivierte T - Zellen, bei denen die Kern - Plasma - Relation zugunsten des Plasmas verschoben ist, in der Lage sind, genügend radioaktives Antigen an ihre Oberfläche zu binden, damit eine zur Schädigung ausreichende Strahlendosis akkumulieren kann.

6.5.4.2 Konkurrenz zwischen Radioantigensuizid und Antigenstimulation

Ein letzter und möglicherweise entscheidender Gesichtspunkt, unter dem das Mißlingen der Radioantigensuizidversuche zu sehen ist, liefert die Arbeit von Driscoll et al. (17) aus dem Jahre 1979. Sie konnten nämlich durch Inkubation von A1 - sensibilisierten Zellen mit dem Antigen die zum erfolgreichen

Transfer der passiven EAE notwendige Zellzahl um den Faktor 500 bis 1000 senken. Allerdings stimulierten sie in diesen Versuchen 5 - 10 x weniger Zellen mit 10 µg A1 - Protein, während wir in unseren Radioantigensuizidversuchen maximal 1,8 µg des jodierten Antigens einsetzten.

Trotz dieses Unterschiedes kommt es in unseren Versuchen möglicherweise zur Konkurrenz zweier Reaktionsabläufe. Auf der einen Seite treten bei der Inkubation der sensibilisierten Zellen mit ^{125}J - A1 vielleicht wirklich Strahlenschäden durch das ^{125}J auf, gleichzeitig bildet das verabreichte A1 jedoch einen Proliferationsreiz, so daß dadurch entweder wieder neue Zellen entstehen bzw. die Strahlenschäden, wie von Sprent et al. (76) erwähnt, durch die hypermetabolische Stoffwechsellage der aktivierten Zellen sofort wieder repariert werden.

Wir müssen daher feststellen, daß der Radioantigensuizid als in vivo - Therapiemethode der EAE bei Ratten, als die er letztendlich gedacht war, nicht anwendbar ist.

7. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die experimentelle allergische Encephalomyelitis (EAE) ist eine T - Lymphozyten - induzierte Autoimmunerkrankung. Ziel der vorliegenden Arbeit war, durch Inkubation mit ^{125}J - A1 - Protein eine selektive Zerstörung dieser T - Zellen herbeizuführen (Radioantigensuizid), um so eine Suppression der EAE zu erreichen. In den Versuchen hierzu wurden nachfolgende Ergebnisse und Erkenntnisse gewonnen.

1. Die aktive EAE konnte mit A1 - Protein aus Meerschweinchengehirn und komplettem Freundschen Adjuvans (CFA) in 88 von 88 Fällen bei Lewis - Ratten erzeugt werden. Bovines A1 - Protein erwies sich in unseren Versuchen als ungeeignet (0/15).

2. Um die passive EAE auf Lewis - Ratten in der Mehrzahl der Fälle (63/67; 94 %) übertragen zu können, waren mehr als 2×10^8 Lymphozyten notwendig, wobei der Schweregrad der EAE durch wesentlich höhere Zellzahlen kaum beeinflußt wurde. Der mittlere Schweregrad der passiven EAE war etwas geringer als der der aktiven Erkrankung. Mit 14,2 Tagen zwischen Sensibilisierung der Zellspender und Ausbruch der passiven EAE im Empfänger vergeht eine deutlich längere Zeitspanne als zum Ausbruch der aktiven EAE (12,4 Tage). Dies läßt auf eine Beteiligung des Immunsystems des Empfängers am Krankheitsgeschehen schließen.

3. Die klinische Symptomatik der EAE hatte in allen kontrollierten Fällen ein histologisches Korrelat mit perivaskulären entzündlichen Infiltraten im ZNS der Tiere. Neben der großen Anzahl von Foci im Zentralnervensystem wurden in einigen Fällen auch Läsionen der Cauda equina und des Nervus ischiadicus gefunden, was auf eine begleitende EAN hinweist.

4. Durch direkte Röntgenbestrahlung der Lymphozyten, die am 9. Tag nach Sensibilisierung der Spendertiere gewonnen wurden, konnten wir mit Strahlendosen ab 400 rad und nachfolgender 20 - stündiger Inkubation bei $4^{o}C$ die Übertragung der EAE unterdrücken.

5. Autoradiografisch wurde nachgewiesen, daß sich unter den übertragenen Lymphozyten ca. 1,8 % Zellen befinden, die mit ^{125}J - A1 - Protein reagieren. Es handelt sich hierbei vorwiegend um kleine, aber auch um große Lymphozyten und Blastzellen. In der CFA - Kontrollgruppe lagerten 10 x weniger Zellen das radioaktive Antigen an. Diese dennoch hohe Zahl wird durch eine mögliche Kreuzreaktivität zwischen dem A1 - Protein und dem mykobakteriellen Antigen erklärt.
Eine Differenzierung der Zellen in T - oder B - Lymphozyten konnte aufgrund mangelhafter Rosettierungseigenschaften der Rattenlymphozyten nicht vorgenommen werden.

6. Obwohl rein rechnerisch die applizierte Strahlendosis hätte ausreichen müssen, konnten wir in den durchgeführten Radioantigensuizidversuchen die EAE nicht unterdrücken. Der wesentliche Unterschied zu geglückten Versuchen anderer Autoren

beruht darauf, daß wir durch selektive Ausschaltung aktivierter Zellen eine Erkrankung unterdrücken wollten, jene als Erfolgskontrolle in der Regel nur in vitro - Tests durchführten. Auf die erhöhte Strahlenresistenz aktivierter T - Lymphozyten wurde hingewiesen.

7. Möglicherweise ist der Effekt des Radioantigensuizids durch den gleichzeitigen Proliferationsreiz durch das Antigen, das mit dem ^{125}J - A1 verabreicht wird, überlagert.

8. Somit erweist sich der Radioantigensuizid als ungeeignet zur Suppression der EAE bei Lewis - Ratten.

Herrn Prof. Dr. A. M. Kellerer danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Strahlenkunde.

Herrn Prof. Dr. Dr. K. Hempel danke ich besonders herzlich für die Überlassung des Themas, für die Einführung zu experimentellem Arbeiten und für seine unermüdliche Bereitschaft bei der Durchführung und Diskussion der vorliegenden Untersuchungen.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. B. Maurer - Schultze, die bei der Durchführung der Autoradiogramme behilflich war, sowie den Professoren Dr. K. Schimrigk, Homburg/Saar, und Dr. W. Wechsler, Düsseldorf, für die histologische Auswertung der Experimente.

Weiterer Dank gilt Herrn Dr. E. Günther, Freiburg, für die Überlassung der Lewis - Ratten.

Bei Frau Monika Grünbeck und Fräulein Angela Stirnweis möchte ich mich für die technische Assistenz und bei Herrn Richard Bauer für seine Bemühungen um die Pflege und Zucht des Rattenstammes bedanken.

8. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Ada, G. L., Byrt, P.
Specific inactivation of antigen - reactive cells with ^{125}J - labelled antigen
Nature, 222 (1969), 1291

2. Ada, G. L., Byrt, P., Mandel, T., Warner, N.
A specific reaction between antigen labelled with radioactive iodine and lymphocyte - like cells from normal, tolerant and immunized mice or rats
In: Developmental aspects of antibody formation and structure. Sterzl, J., Riha, I. (Eds.)
Academic Press, New York & London (1970), 503

3. Alvord, E. C., Shaw, C. - M., Hruby, S., Kies, M. W.
Has myelin basic protein received a fair trial in the treatment of multiple sclerosis
Ann. Neurol., 6 (1979), 461

4. Alvord, E. C., Shaw, C. - M., Hruby, S.
Myelin basic protein treatment of experimental allergic encephalomyelitis in monkeys
Ann. Neurol., 6 (1979), 469

5. Anderson, R. E., Sprent, J., Miller, J. F. A. P.
Radiosensitivity of T and B lymphocytes
I. Effect of irradiation on cell migration
Eur. J. Immunol., 4 (1974), 199

6. Asherson, G. L., Zembala, M., Mayhew, B.
Analysis of the induction phase of contact sensitivity by footpad transfer of regional lymph node cells
Immunology, 32 (1977), 81

7. Basten, A., Miller, J. F. A. P., Warner, N. L., Pye, J.
Specific inactivation of thymus - derived (T) and non - thymus - derived (B) lymphocytes by ^{125}J - labelled antigen
Nature New Biol., 231 (1971), 104

8. Boehme, D. H., Umezawa, H., Hashim, G., Marks, N.
Treatment of experimental allergic encephalomyelitis with an inhibitor of cathepsin D (pepstatin)
Neurochem. Res., 3 (1978), 185

9. Bond, V. P., Fliedner, T. M., Archambeau, J. D.
In: Mammalian radiation lethality
Academic Press, New York & London (1965)

10. Bradley, E. W., Chan, P. C., Adelstein, S. J.
The radiotoxicity of iodine - 125 in mammalian cells
Radiat. Res., 64 (1975), 555

11. Campbell, B., Vogel, P. J., Fisher, E., Lorenz, R.
Myelin basic protein administration in multiple sclerosis
Arch. Neurol., 29 (1973), 10

12. Cooper, M. G., Ada, G. L.
Delayed - type hypersensitivity in the mouse
III. Inactivation of thymus - derived effector cells and their precursors
Scand. J. Immunol., 1 (1972), 247

13. Deibler, G. E., Martenson, R. E., Kies, M. W.
Large scale preparation of myelin basic protein from central nervous tissue of several mammalian species
Prep. Biochem., 2 (1972), 139

14. Driscoll, B. F., Kies, M. W., Alvord, E. C.
Successful treatment of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in guinea pigs with homologous myelin basic protein
J. Immunol., 112 (1974), 392

15. Driscoll, B. F., Kies, M. W., Alvord, E. C.
Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis (EAE): Prevention of successful transfer by treatment of donors with myelin basic protein
J. Immunol., 114 (1975), 291

16. Driscoll, B. F., Kies, M. W., Alvord, E. C.
Protection against experimental allergic encephalomyelitis with peptides derived from myelin basic protein: Presence of intact encephalitogenic site is essential
J. Immunol., 117 (1976), 110

17. Driscoll, B. F., Kies, M. W., Alvord, E. C.
Transfer of experimental allergic encephalomyelitis with guinea pig peritoneal exudate cells
Science, 203 (1979), 547

18. Elliott, B. E., Haskill, J. S.
Characterization of thymus - derived and bone marrow - derived rosette - forming lymphocytes
Eur. J. Immunol., 3 (1973), 68

19. Englert, D., Hempel, K.
Decrease in motor activity - an early symptom in the course of experimental allergic encephalomyelitis (EAE)
Experientia, 35 (1979), 1207

20. Falk, G. A., Kies, M. W., Alvord, E. C.
Delayed hypersensitivity to myelin basic protein in the passive transfer of experimental allergic encephalomyelitis
J. Immunol., 101 (1968), 638

21. Ferraro, A., Cazzullo, C. L.
Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs
J. Neuropath. Exp. Neurol., 8 (1949), 61

22. Gasser, D. L., Palm, J., Gonatas, N. K.
Genetic control of susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and the Ag - B locus of rats
J. Immunol., 115 (1975), 431

23. Ghetie, V., Nilsson, K., Sjöquist, J.
Detection and quantitation of IgG on the surface of human lymphoid cells by rosette formation with protein A - coated sheep red blood cells
Eur. J. Immunol., 4 (1974), 500

24. Ghose, T., Guclu, A.
Cure of a mouse lymphoma with radio - iodinated antibody
Eur. J. Cancer, 10 (1974), 787

25. Golan, D. T., Borel, Y.
Deletion of hapten - binding cells by a highly radioactive ^{125}J conjugate
J. Exp. Med., 136 (1972), 305

26. Gold, E. R., Fudenberg, H. H.
Chromic chloride: A coupling reagent for passive hemagglutination reactions
J. Immunol., 99 (1967), 859

27. Gonatas, N. K., Howard, J. C.
Inhibition of experimental allergic encephalomyelitis in rats severely depleted of T cells
Science, 186 (1974), 839

28. Gonsette, R. E., Demonty, L., Delmotte, P.
Intensive immunosuppression with cyclophosphamide in multiple sclerosis
J. Neurol., 214 (1977), 173

29. Gonsette, R. E., Delmotte, P., Demonty, L.
Failure of basic protein therapy for multiple sclerosis
J. Neurol., 216 (1977), 27

30. Günther, E., Odenthal, H., Wechsler, W.
Association between susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and the major histocompatibility system in congenic rat strains
Clin. Exp. Immunol., 32 (1978), 429

31. Hashim, G. A., Schilling, F. J.
Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by nonencephalitogenic basic peptides
Arch. Biochem. Biophys., 156 (1973), 287

32. Hashim, G. A.
Non - encephalitogenic antigen - induced suppression and reversal of allergic encephalomyelitis
Nature, 256 (1975), 593

33. Hofer, K. G., Harris, C. R., Smith, J. M.
Radiotoxicity of intracellular ^{67}Ga, ^{125}J and ^{3}H Nuclear versus cytoplasmic radiation effects in murine L1210 leukaemia
Int. J. Radiat. Biol., 28 (1975), 225

34. Hofer, K. G., Keough, G., Smith, J. M.
Biological toxicity of auger emitters: Molecular fragmentation versus electron irradiation
Cur. Top. Radiat. Res. Q., 12 (1977), 335

35. Humphrey, J. H., Roelants, G., Willcox, N.
Specific lethal radioactive antigens
In: Cell interactions and receptor antibodies in immune response. Mäkelä, O., Cross, A., Kosunen, T. U. (Eds.)
Academic Press, London & New York (1971), 123

36. Hunter, W. M., Greenwood, F. C.
Preparation of iodine - 131 labeled human growth hormone of high specific activity
Nature, 194 (1962), 495

37. Khan, A., Levine, S.
Further studies on the inhibition of allergic encephalomyelitis by L - asparaginase
J. Immunol., 113 (1974), 367

38. Kies, M. W., Alvord, E. C.
Prevention of allergic encephalomyelits by prior injection of adjuvants
Nature, 182 (1958), 1106

39. Leibowitz, S., Kennedy, L.
Cerebral vascular permeability and cellular infiltration in experimental allergic encephalomyelitis
Immunology, 22 (1972), 859

40. Levine, S., Wenk, E. J.
Passive transfer of allergic encephalomyelitis: Acceleration by adrenalectomy
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 121 (1966), 301

41. Levine, S., Simon, J., Wenk, E. J.
Edema of the spinal cord in experimental allergic encephalomyelitis
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 123 (1966), 539

42. Levine, S., Wenk, E. J.
Rapid passive transfer of allergic encephalomyelitis
J. Immunol., 99 (1967), 1277

43. Levine, S., Sowinski, R.
Passive transfer of allergic adrenalitis and encephalomyelitis with whole blood
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 129 (1968), 221

44. Levine, S., Prineas, J., Scheinberg, L. C.
Allergic encephalomyelitis: Inhibition of cellular transfer by X - irradiation
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 131 (1969), 986

45. Levine, S., Sowinski, R.
Suppression of the hyperacute form of experimental allergic encephalomyelitis by drugs
Arch. int. Pharmacodyn., 230 (1977), 309

46. Levine, S., Sowinski, R., Shaw, C. - M., Alvord, E. C.
Do neurological signs occur in experimental allergic encephalomyelitis in the absence of inflammatory lesions of the central nervous system
J. Neuropath. Exp. Neurol., 34 (1975), 501

47. Levinson, A. I., Lisak, R. P., Zweiman, B., Wilkerson, L. D.
Reactive and non - reactive lymphocytes in experimental allergic encephalomyelitis
Immunology, 33 (1977), 621

48. Lipton, M. M., Freund, J.
Allergic encephalomyelitis in the rat induced by the intracutaneous injection of central nervous system tissue and adjuvants
J. Immunol., 71 (1953), 98

49. Lipton, M. M., Freund, J.
The transfer of experimental allergic encephalomyelitis in the rat by means of parabiosis
J. Immunol., 71 (1953), 380

50. Lumsden, C. E.
The problem of prevention and control of auto - allergic inflammation in the nervous system
Z. Immun. - Forsch., 126 (1964), 209

51. Martenson, R. E., Levine, S., Sowinski, R.
The location of regions in guinea pig and bovine myelin basic proteins which induce experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats
J. Immunol., 114 (1975), 592

52. McFarlin, D. E., Hsu, S. C., Slemenda, S. B., Chou, F. C., Kibler, R. F.
The immune response against myelin basic protein in two strains of rat with different genetic capacity to develop experimental allergic encephalomyelitis
J. Exp. Med., 141 (1975), 72

53. Mills, J. A., Cooperband, S. R.
Lymphocyte physiology
Ann. Rev. Med., 22 (1971), 185

54. Mishell, R. I., Dutton, R. W.
Immunization of spleen cell cultures
J. Exp. Med., 126 (1967), 423

55. Order, S. E.
The effects of therapeutic irradiation on lymphocytes and immunity
Cancer, 39 (1977), 737

56. Ortiz - Ortiz, L., Nakamura, R. M., Weigle, W. O.
T cell requirement for experimental allergic encephalomyelitis induction in the rat
J. Immunol., 117 (1976), 576

57. Ortiz - Ortiz, L., Weigle, W. O.
Cellular events in the induction of experimental allergic encephalomyelitis in rats
J. Exp. Med., 144 (1976), 604

58. Pang, G. T. M., Baguley, D. M., Wilson, J. D.
Spontaneous rosettes as a T - lymphocyte marker: A modified method giving consistent results. SRBC rosettes
J. Immunol. Meth., 4 (1974), 41

59. Paterson, P. Y.
Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells
J. Exp. Med., 111 (1960), 119

60. Paterson, P. Y., Weiss, H. S.
Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by intracerebral injection of lymphoid cells
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119 (1965), 267

61. Paterson, P. Y.
Experimental allergic encephalomyelitis and autoimmune disease
Advan. Immunol., 5 (1966), 131

62. Paterson, P. Y., Drobish, D. H.
Cyclophosphamide: Effect on experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats
Science, 165 (1969), 191

63. Paterson, P. Y., Drobish, D. H., Hanson, M. A., Jacobs, A. F.
Induction of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats
Int. Arch. Allergy, 37 (1970), 26

64. Paterson, P. Y., Richardson, W. P., Drobish, D. G.
Cellular transfer of experimental allergic encephalomyelitis: Altered disease pattern in irradiated recipient Lewis rats
Cell. Immunol., 16 (1975), 48

65. Paterson, P. Y.
Experimental allergic encephalomyelitis: Role of fibrin deposition in immunopathogenesis of inflammation in rats
Fed. Proc., 35 (1976), 2428

66. Patzold, U., Pocklington, P.
Azathioprine in multiple sclerosis - A 3 year controlled study of its effectiveness
J. Neurol., 223 (1980), 97

67. Pearson, T., Levy, J., Kilburn, D.
The effect of specific cell inactivation on the cellular immune response to ferredoxin peptides
Eur. J. Immunol., 5 (1975), 65

68. Pearson, T., Levy, J., Kilburn, D., Fairhurst, K.
The effect of antigen suicide on numbers of cells binding defined antigenic determinants
J. Immunol. Meth., 10 (1976), 99

69. Piliero, S. J., Cremonese, P.
Acute allergic encephalomyelitis (EAE) in the rat with special reference to immunologic and demyelinization effects
J. Reticuloendothel. Soc., 14 (1973), 100

70. Prosser, J. S.
Survival of human T and B lymphocytes after X - irradiation
Int. J. Radiat. Biol., 30 (1976), 459

71. Purdy, C. W., Loan, R. W.
Effect of irradiation on adoptive immunization in experimental allergic encephalomyelitis
Int. Arch. Allergy, 40 (1971), 842

72. Rauch, H. C., Raffel, S.
Antigen uptake by specifically reactive cells in experimental allergic encephalomyelitis
Ann. N. Y. Acad. Sci., 122 (1965), 297

73. Roelants, G. E., Askonas, B. A.
Cell cooperation in antibody induction. The susceptibility of helper cells to specific lethal radioactive antigen
Eur. J. Immunol., 1 (1971), 151

74. Schmid, G., Thomas, G., Hempel, K., Grüninger, W.
Radioimmunological determination of myelin basic protein (MBP) and MBP + antibodies
Europ. Neurol., 12 (1974), 173

75. Seiden, G. E.
Sensitization of lymphoid cells in tissue culture to EAE encephalitogen
J. Neuropath. Exp. Neurol., 26 (1967), 551

76. Sprent, J., Anderson, R. E., Miller, J. F. A. P.
Radiosensitivity of T and B lymphocytes
II. Effect of irradiation on response of T cells to alloantigens
Eur. J. Immunol., 4 (1974), 204

77. Stone, S. H.
Transfer of allergic encephalomyelitis by lymph node cells in inbred guinea pigs
Science, 134 (1961), 619

78. Tagungsbericht
Suppression of multiple sclerosis
Br. Med. J., 280 (1980), 65

79. Teitelbaum, D., Webb, C., Meshorer, A., Arnon, R., Sela, M.
Suppression by several synthetic polypeptides of experimental allergic encephalomyelitis induced in guinea pigs and rabbits with bovine and human basic encephalitogen
Eur. J. Immunol., 3 (1973), 273

80. Traugott, U., Raine, C. S.
Experimental allergic encephalomyelitis in inbred guinea pigs: Correlation of decrease in early T cells with clinical signs in suppressed and unsuppressed animals
Cell. Immunol., 34 (1977), 146

81. Trowell, O. A.
The sensitivity of lymphocytes to ionizing radiation
J. Pathol. Bact., 64 (1952), 687

82. Unanue, E. R.
Antigen - binding cells
I. Their identification and role in the immune response
J. Immunol., 107 (1971), 1168

83. Van Arman, C. G.
Pathway to adjuvant arthritis
Fed. Proc., 35 (1976), 2442

84. Vandenbark, A. A., Gibbins, B. L., Hinrichs, D. J.
Immunosuppressive activity of serum during the development of experimental allergic encephalomyelitis
Cell. Immunol., 11 (1974),1

85. Vandenbark, A. A., Burger, D. R., Vetto, R. M.
Cell - mediated immunity in experimental allergic encephalomyelitis: Cross reactivity between myelin basic protein and mycobacteria antigens
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 148 (1975), 1233

86. Van Rooijen, N.
Labelling of lymphocytes with various radioisotopes for in vivo tracer studies; a review
J. Immunol. Meth., 15 (1977), 267

87. Warters, R. L., Hofer, K. G., Harris, C. R., Smith, J. M.
Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells: Elucidation of the primary site of radiation damage
Cur. Top. Radiat. Res. Q., 12 (1977), 389

88. Watnick, A. S., Sabin, C.
The effect of clonixin and betamethasone on adjuvant - induced arthritis and experimental allergic encephalomyelitis in rats
Japan. J. Pharmacol., 22 (1972), 741

89. Whitehouse, D. J., Whitehouse, M. W., Pearson, C. M.
Passive transfer of adjuvant - induced arthritis and allergic encephalomyelitis in rats using thoracic duct lymphocytes
Nature, 224 (1969), 1322

90. Whitehouse, M. W., Orr, K. J., Beck, F. W., Pearson, C. M.
Freund's adjuvants: Relationship of arthritogenicity and adjuvanticity in rats to vehicle composition
Immunology, 27 (1974), 311

91. Williams, R. M., Moore, M. J.
Linkage of susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis to the major histocompatibility locus in the rat
J. Exp. Med., 138 (1973), 775

92. Woodruff, J., Gesner, B. M.
Lymphocytes: Circulation altered by trypsin
Science, 161 (1968), 176

93. Yung, L. L. L., Diener, E., McPherson, T. A., Barton, M. A. Hyde, H. A.
Antigen - binding lymphocytes in normal man and guinea pig to human encephalitogenic protein
J. Immunol., 110 (1973), 1383

9. A B K Ü R Z U N G E N

A1 - Protein, A1	Basisches Myelinprotein
CFA	Komplettes Freundsches Adjuvans
CHO - Zellen	Chinesische Hamster Ovarialzellen
EAE	Experimentelle allergische Encephalomyelitis
EAN	Experimentelle allergische Neuritis
FCS	Fötales Kälberserum
MBP	Myelin basic protein, basisches Myelinprotein
SDS	Natriumdodecylsulfat

L E B E N S L A U F

Am 6. August 1952 wurde ich, Dieter Englert, als Sohn des Bundesbahnhauptsekretärs Eduard Englert und seiner Frau Melanie, geb. Merz, in Heigenbrücken geboren.

Von 1958 bis 1962 besuchte ich die Volksschule in Heigenbrücken. Anschließend wechselte ich an das Friedrich - Dessauer - Gymnasium in Aschaffenburg, wo ich 1972 mein Abitur ablegte.

Nachdem ich im Wintersemester 1972 an der Universität Würzburg Betriebswirtschaftslehre studiert hatte, nahm ich im darauffolgenden Sommersemester an der gleichen Hochschule das Medizinstudium auf.

Jeweils im Wintersemester 1975, 1976, 1978 und 1979 bestand ich das Physikum und den ersten, zweiten und dritten Teil der Ärztlichen Prüfung.

Die Approbation als Arzt wurde mir am 7. Juni 1979 erteilt.

Seit 1. Juli 1979 bin ich als wissenschaftlicher Assistent am Institut für Medizinische Strahlenkunde der Universität Würzburg beschäftigt. Hier arbeite ich am DFG - Forschungsprojekt "Ätiologie und Pathogenese der Multiplen Sklerose und verwandter Erkrankungen" mit.

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit führte ich am gleichen Institut im Zeitraum vom Wintersemester 1976 bis Sommer 1980 durch.

Dieter Englert

Druck: Böhler-Verlag 87 Würzburg, Seilerstr. 10-10a